



*ENZYWELL*

**EPSTEIN BARR EA IgM**

**REF** 91059 (96 tests)

Prodotto da/Manufactured by/Fabricado por:  
DIESSE Diagnostica Senese  
Via delle Rose 10  
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy



**INDICE / INDEX/ INDICE / CONTEÚDO**

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / INDICACIONES DE USO/ UTILIZAÇÃO PRETENDIDA
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCÍPIOS DO TESTE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTEÚDA DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUÇÕES
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / PROCEDIMIENTO / PROCEDIMENTO DO ENSAIO
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST/ ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDAÇÃO DO TESTE
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / ESPECIFICIDADE ANALÍTICA
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO
15. PRECISIONE / PRECISION / PRECISIÓN / PRECISÃO
16. GUIDA AI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING" / GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / BIBLIOGRAFÍA / REFERÊNCIAS

**RIEDEL**  
**PHARMACEUTICALS**  
**ISTRUZIONI PER L'USO**

**ENZYWELL**  
**EPSTEIN BARR**  
**EA IgM**

REF 91059

(Italiano)

**1. UTILIZZAZIONE**

**METODO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgM ANTI-EARLY ANTIGEN DEL VIRUS DI EPSTEIN-BARR VIRUS NEL SIERO UMANO. DA UTILIZZARE COME AUSILIO ALLA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA EPSTEIN BARR VIRUS.**

**2. INTRODUZIONE**

Gli antigeni precoci ("Early Antigens") del virus di Epstein Barr (EBV-EA) sono proteine virali prodotte precocemente nel corso dell'infezione litica. La determinazione degli anticorpi serici anti-EBV-EA mediante immunofluorescenza indiretta è stata a lungo utilizzata in associazione alla determinazione delle IgG e IgM dirette verso gli antigeni capsidici (VCA) e delle IgG dirette verso un antigene nucleare (EBNA-1) per la diagnosi della mononucleosi infettiva (IM). Recentemente è stato dimostrato che la determinazione mediante metodo immunoenzimatico delle IgG e IgM seriche verso due proteine precoci, la p138 e la p54, correla bene con i metodi di immunofluorescenza indiretta e può essere utilizzata, oltre che come complemento alla determinazione degli anticorpi anti-VCA, anche in sostituzione di questi per la diagnosi di IM.

Il kit per la determinazione con metodo immunoenzimatico delle IgG e IgM anti-EBV-EA impiega polipeptidi ricombinanti prodotti in E. coli contenenti gli epitopi delle proteine p138 e p54.

**3. PRINCIPIO DEL METODO**

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). Gli antigeni ricombinanti vengono legati alla fase solida. Per incubazione con siero umano diluito le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene. Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti M umane marcati con perossidasi.

Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi.

Il colore che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame.

**4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI**

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.

- **Portare i reattivi a temperatura ambiente prima dell'uso.**

**MT PLATE** MICROPIASTRA 1 x 96 pozzetti sensibilizzati con proteine ricombinanti degli antigeni precoci di Epstein-Barr virus.

Uso: Aprire l'involucro delle strips dalla parte opposta al codice (L, seguita dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto ed inserire i pozzetti necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

**CONJ** CONIUGATO 1 x 16 mL

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti IgM umane marcati con perossidasi contenente fenolo 0,05% e Bronidox 0,02% . Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

**CONTROL +** CONTROLLO POSITIVO 1x 1.6 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi IgM, in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

**CONTROL CUT-OFF** CONTROLLO CUT OFF 1x 2.5 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi IgM, in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

**CONTROL IgG -** IgG CONTROLLO NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**  
**DEL PANEL EBV, REF 91055 VCA IgG, 91056 VCA IgM, 91057 EBNA IgG, 91058 EA IgG, 91059 EA IgM**

**Contenuto:** Siero umano in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

**WASH BUF 10x** TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

**Contenuto:** Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5%.

**Preparazione:** Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

**SAMP DIL 10** DILUENTE 10 (PF93621) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

**Contenuto:** Soluzione salina tamponata (PBS) contenente proteine 10% p/v e sodio azide 0,09% più colorante (metilarancio).

**SORBENT G** DILUENTE EBV 1 x 7 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Da porre nei pozzetti per neutralizzare le reazioni aspecifiche.

**Contenuto:** Soluzione salina tamponata (PBS) contenente sodio azide 0,09% e siero bovino 10%. Pronto all'uso.

**SUBS TMB** SUBSTRATO (PF93619) 1x 12 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Pronto all'uso.

**Contenuto:** Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

#### **ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO.**

- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm, con linearità fino ad OD >= 2,000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi compresi tra 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µL di soluzione

#### **5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI**

**I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.**

**La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.**

#### **I Reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:**

<b>REAGENTE</b>	<b>CONDIZIONI</b>
MICROPIASTRA	5 settimane 2/8°C busta di polietilene
CONTROLLI	5 settimane 2/8°C
CONIUGATO	5 settimane 2/8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C; 1 settimana a 15/30°C; conservare al buio
DILUENTE CAMPIONI	fino alla scadenza a 2/8°C
TAMPONE DI LAVAGGIO	p.uso 2 settimane 2/8°C, 5 gg 15/30 °C
SORBENT G	5 settimane 2/8°C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2/8°C

#### **6. PRECAUZIONI ED AVVERTENZE**

**SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO**

*Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HbsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV.. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.*

**Smaltimento dei residui: i campioni di siero e i reagenti usati devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di legge vigenti.**

#### Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
2. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
  - a) Il tampone di lavaggio contiene detergenti
  - b) Il coniugato contiene fenolo
  - c) Il substrato è acido
  - d) I calibratori contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi.

Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
3. Le apparecchiature non disposable devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1 h a 121°C; i disposables devono essere autoclavati o inceneriti.
4. L'acido solforico contenuto nello Stop Solution e l'acido cloridrico usato per lavare la vetreria sono corrosivi; tali sostanze devono essere adoperate con cautela. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulita, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

#### Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**  
Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO<sub>2</sub>.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
12. L'uso del kit con strumento automatici deve essere validato dall'utilizzatore.

13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:

- installazione e requisiti particolari
- principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
- specifiche del produttore e performance dello strumento
- manutenzione e assistenza tecnica

## **7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE**

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato con appropriati accorgimenti come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C per periodi maggiori a -20°C e può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima del dosaggio. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

Campioni fortemente lipemici, itterici, emolizzati o inquinati non dovrebbero essere utilizzati. **Il test non è applicabile al plasma umano.**

## **8. PROCEDIMENTO**

### Tecnica manuale

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).

Diluire i campioni 1:26 dispensando 40 µL di siero in 1 mL di diluente. Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato. Distribuire 50 µL di Sorbent G e 50 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato). In uno strip porre i controlli (NON DILUITI) (100 µL per pozzetto senza il Sorbent G). Il requisito minimo indispensabile è di 1 controllo negativo, 2 cut-off e 1 positivo.

Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 45 min. a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30 secondi ciascuno (300 µL) si aggiungono 100 µL del coniugato per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Si lava di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi si distribuisce il Substrato, 100 µL/pozzetto. Dopo 15 min. a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la Assorbanza (O.D.) a 450 nm o a 450/620 nm entro 30 min.

<b>9. Schema del saggio</b>
-----------------------------

- |        |   |
|--------|---|
| STEP 1 | Distribuire 50 µL di Sorbent G, 50 µL di siero diluito e 100 µL dei controlli nei pozzetti dello strip. |
|        | -   |
|        | Incubare 45 min. a 37°C   |
|        | -   |
|        | Lavare 4 volte (300 µL)   |
|        | -   |
| STEP 2 | Mettere 100 µL di coniugato per pozzetto  |
|        | -   |
|        | Incubare 45 min. a 37°C   |
|        | -   |
|        | Lavare 4 volte (300 µL)   |
|        | -   |
| STEP 3 | Mettere 100 µL di Substrato per pozzetto  |
|        | -   |
|        | Incubare 15 min. a t.a.   |
|        | -   |
| STEP 4 | Aggiungere 100 µL di Stop Solution  |
|        | -   |
|        | Leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min.   |

## **10. VALIDAZIONE DEL TEST**

Togliere il valore del bianco ( $\leq 0.150$ ) a tutte le altre letture. I valori in O.D. del siero di controllo Cut-off devono essere entro il 25% del valore medio. Scartare eventualmente il valore aberrante e ricalcolare la media. Il positivo deve avere O.D. pari almeno a 1.5 volte il Cut-off. Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere  $\leq 0.6$ . La D.O. del Cut-off deve essere  $\geq 0.2$  a 450 nm e  $\geq 0.16$  a 450/620 nm.

## **11. INTERPRETAZIONE DEL TEST**

### Risultati qualitativi

Se il valore dell'assorbanza del campione è superiore al Cut-off il campione risulta positivo per la presenza di IgM specifiche per l'antigene.

Calcolare il rapporto fra il valore della D.O. del campione in esame e quello del Cut-off (INDEX). Il campione sarà giudicato:

*Positivo:* quando il rapporto è > 1.2.

*Dubbio:* = ± 20% del Cut-off.

*Negativo:* quando il rapporto è < 0.8.

In caso di risultato dubbio ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio, ripetere il prelievo.

### Risultati quantitativi

#### Unità Arbitrarie (AU)

I risultati positivi possono essere espressi in unità arbitrarie con questa semplice operazione:

$$AU = \frac{\text{O.D. campione}}{\text{O.D. Cut-off}}$$

Comunemente questo rapporto è considerato un valore "indice" di positività.

## **12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**

Il risultato del test deve servire unicamente come aiuto nella diagnosi e deve essere comunque valutato insieme a dati provenienti da altre procedure diagnostiche.

Esiste la possibilità di reazioni incrociate con campioni contenenti anticorpi anti-E. coli.

Le caratteristiche della performance non sono state stabilite per una interpretazione visiva. Inoltre non sono state studiate in pazienti affetti da carcinoma nasofaringeo, linfoma di Burkitt nè da altre linfadenopatie associate all'EBV, ad esclusione della mononucleosi correlata all'EBV.

Non può essere utilizzata per la diagnosi un unico parametro. L'interpretazione accurata di un'infezione da EBV si deve basare sui risultati del VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG, EA IgG ed EA IgM, oltre agli anticorpi eterofili

Il test va effettuato sul siero. Non è stata stabilita l'applicazione su sangue intero nè su plasma.

## **13. SPECIFICITÀ ANALITICA**

10 campioni negativi agli anticorpi IgM anti-EA contenevano anticorpi IgM contro virus quali CMV, Herpes Simplex e Varicella. In nessun caso la presenza di detti anticorpi interferiva con il kit Enzywell EA IgM.

## **14. SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA**

Sono stati analizzati 117 sieri con il kit Enzywell ed un kit proveniente dal commercio.

I risultati sono riassunti di seguito:

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	57	1
	-	2	57

Il metodo ENZYWELL risulta avere una sensibilità del 96,6% ed una specificità del 98,3%.

## **15. PRECISIONE**

**Precisione all'interno della seduta eseguita su 3 lotti diversi:**

<i>Cut-off n=15</i>	<i>Lotto 014</i>	<i>Lotto 015</i>	<i>Lotto 016</i>
<i>D.O.</i>	0.464	0.515	0.412
<i>CV%</i>	4	9	6

**Precisione tra sedute e tra lotti:**

<i>Campione</i>	<i>INDEX</i>			<i>Media</i>	<i>CV%</i>
	<i>Lotto 014</i>	<i>Lotto 015</i>	<i>Lotto 016</i>		
<i>1</i>	<i>0.1</i>	<i>0.07</i>	<i>0.05</i>	<i>0.07</i>	<i>34</i>
<i>2</i>	<i>1.3</i>	<i>1.5</i>	<i>1.3</i>	<i>1.4</i>	<i>8</i>
<i>3</i>	<i>2.5</i>	<i>2.7</i>	<i>2.6</i>	<i>2.6</i>	<i>4</i>

**16. GUIDA AI PROBLEMI DI UTILIZZO**

<b>PROBLEMA</b>	<b>POSSIBILI FONTI DI ERRORE</b>	<b>AZIONI DA INTRAPRENDERE</b>
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi istruzioni per l'uso punto 4 per il codice corretto).
		Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test.
Seduta invalida (tutti positivi)	Inquinamento del substrato	Prelevare una nuova aliquota del substrato.
	Lavaggio inadeguato	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
Scarsa precisione	Lavaggio incompleto dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Errore del pipettamento	Controllare il funzionamento della pipetta
	Aggiunta dei reagenti troppo lenta	Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente.
	Presenza di bolle d'aria	Evitare la formazione di bolle d'aria durante il pipettamento
	Percorso ottico non limpido	Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con fazzoletto di carta.
Insufficiente sviluppo di colore	Tempo o temperatura di incubazione non corretto	Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione
		Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

**17. BIBLIOGRAFIA**

- Gorgievski H.M., Hinderer W. et al. Serodiagnosis of infectious mononucleosis by using recombinant Epstein-Barr virus antigens and enzyme-linked immunosorbent assay technology. J. Clin. Microbiol. 28: 2305 (1990).
- Middeldorp, J.M. and Herbrink, P. Epstein-Barr virus specific marker molecules for early diagnosis of infectious mononucleosis. J. Virol. Methods 21: 133-146 (1988).
- Luka, J., Chase, R.C. and Pearson G.R. A sensitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) against the major EBV-associated antigens. I. Correlation between ELISA and immunofluorescence titers using purified antigens. J. Immunol. Methods 67: 145-156 (1984).
- Motz, M., Fan J., Seibl R., and Wolf H. Expression of the Epstein Barr Virus 138 KDa early protein in E. coli for the use as antigen in diagnostic tests. Gene 42: 303-312 (1986).





**INSTRUCTIONS FOR USE**

**ENZYWELL  
EPSTEIN BARR  
EA IgM**

**REF** 91059

(English)

**1. INTENDED USE**

**IMMUNOENZYMATIC METHOD FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgM-CLASS ANTIBODIES TO EPSTEIN BARR VIRUS EARLY ANTIGEN IN HUMAN SERUM, AS AN AID IN THE DIAGNOSIS OF EPSTEIN BARR VIRUS.**

**2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST**

The Epstein Barr Early Antigens (EBV-EA) are viral proteins which are produced in the early stages of lythic infection. In the diagnosis of infectious mononucleosis (IM), indirect immunofluorescence has been adopted for a long time for the determination of serum antibodies against EBV-EA, in association with the detection of IgG and IgM against the capsid antigens (VCA), and IgG against a nuclear antigen (EBNA-1). Recently it has been shown that the immunoenzymatic determination of serum IgG and IgM against the two early proteins, p138 and p54, shows good correlation with the indirect immunofluorescence method and can be utilised, not only as a complementary method in the determination of anti-VCA antibodies, but also as a substitute for these methods in the diagnosis of IM.

The DIESSE Kit for the immunoenzymatic determination of IgG and IgM anti-EBV-EA uses recombinant polypeptides produced in E. coli containing epitopes of the proteins p138 and p54.

**3. PRINCIPLE OF THE TEST**

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay).

The recombinant antigens are bound to the solid phase. Following incubation with dilute human serum, the specific immunoglobulins are bound to the antigen.

After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation with the conjugate, composed of human IgM monoclonal antibodies labelled with peroxidase, is performed.

The unbound conjugate is eliminated and the peroxidase substrate is added.

The colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample.

**4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION**

- Reagents are sufficient for 96 determinations.

- **Bring reagents to room temperature before use.**

**MT PLATE** MICROPLATE 1 x 96 wells coated with recombinant EA proteins.

Use: open the package at the opposite end from the code (L, followed by the lot number) which is useful for its identification, remove the support and wells to be used from the foil package, and place the unused wells in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

**CONJ** CONJUGATE 1x 16 mL

Contents: anti human IgM monoclonal antibodies labelled with Peroxidase, in phosphate buffer solution containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

Preparation: ready for use.

**CONTROL +** POSITIVE CONTROL 1 x 1.6 mL

Contents: Diluted human serum at known concentration of anti-EA IgM, in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

Colour: the colour is proportional to the relative antibody titer.

**CONTROL CUT-OFF** CUT OFF CONTROL 1 x 2.5 mL

Contents: Diluted human serum at known concentration of anti-EA IgM, in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

Colour: the colour is proportional to the relative antibody titer.

**CONTROL IgG -** IgG NEGATIVE CONTROL (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS OF THE EBV PANEL, REF 91055 VCA IgG, 91056 VCA IgM, 91057 EBNA IgG, 91058 EA IgG, 91059 EA IgM**

**Contents:** Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

**WASH BUF 10x** WASH BUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

**Contents:** Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5%.

**Preparation:** dilute the required volume 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

**SAMP DIL 10** DILUENT 10 (PF93621) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

To be used to dilute samples.

**Contents:** PBS containing proteins 10% w/v and sodium azide 0,09% containing methyl orange as dye.

**SORBENT G** EBV DILUENT (PF91083) 1 x 7 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

To be placed in the wells to neutralize non specific reactions.

**Contents:** Phosphate buffered saline (PBS) containing sodium azide 0.09% and bovine serum 10% w/v. Ready for use.

**SUBS TMB** SUBSTRATE (PF93619) 1x 12 mL Ready for use. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

**Contents:** Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and hydrogen peroxide 0.01% stabilised in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

#### **MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.**

- Incubator at 37°C
- Microplate reader (wave length 450 nm or 450/620 nm, with linearity up to OD >= 2000)
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µL
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue.

#### **5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS**

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

#### **Reagents have a limited stability after opening and/or preparation**

REAGENT	CONDITIONS
Microplate	5 weeks at 2/8°C, polythene bag
Controls	5 weeks at 2/8°C
Conjugate	5 weeks at 2/8°C
Substrate	up to the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C; store in the dark
Sample Diluent	up to the expiry date at 2/8°C
Wash Buffer	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
Sorbent G	5 weeks at 2/8°C
Stop Solution	up to the expiry date at 2/8°C

#### **6. PRECAUTIONS**

**FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.**

**Caution:**

*This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by FDA-approved methods for the presence of HbsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling material of human origin.*

**Waste disposal: serum samples and reagents once used must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.**

**Health and Safety Information**

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
  - a) The Wash Buffer contains detergents
  - b) The conjugate contains phenol
  - c) The substrate is acid
  - d) The controls contain 0.09% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides.

If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
3. Non-disposable apparatus should be sterilized after use. The preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C; disposables should be autoclaved or incinerated.
4. Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If they come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
5. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

**Analytical precautions**

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature.
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO<sub>2</sub> incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. Use of the kit with automatic instruments must be validated by the user.
13. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:

- installation and particular requisites
- operating principles, instructions, precautions and risks
- manufacturer's specifications and instrument performance
- servicing and maintenance

## **7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE**

The sample is composed of serum obtained from blood collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at -20°C, and can be thawed a maximum of 3 times. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted samples must be carefully mixed before performing the test. Heat inactivation can lead to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided. **The test is not applicable to human plasma.**

## **8. TEST PROCEDURE**

### *Manual Technique*

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).

Dilute samples 1:26 distributing 40 µL of serum into 1 mL of diluent. Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture. Dispense 50 µL of Sorbent G and 50 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED controls in a strip (100 µL in each well without the Sorbent G). The minimum requisite is 1 negative control, 2 cut-off and 1 positive control.

Wells are covered with protective film and incubated for 45 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µL), add 100 µL of the conjugate to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well.

After 15 minutes at room temperature the enzymatic reaction is stopped with 100 µL of Stop Solution.

The adsorbance (O.D.) is read at 450 nm or at 450/620 nm within 30 min.

<b>9. SCHEME OF TEST PROCEDURE</b>
------------------------------------

- |        |   |
|--------|---|
| STEP 1 | Place 50 µL of Sorbent G, 50 µL of diluted sample and 100 µL controls in the wells of the strips. |
|        | -   |
|        | Incubate for 45 min. at 37°C  |
|        | -   |
|        | Wash 4 times (300 µL)   |
|        | -   |
| STEP 2 | Add 100 µL of conjugate to each well  |
|        | -   |
|        | Incubate for 45 min. at 37°C  |
|        | -   |
|        | Wash 4 times (300 µL)   |
|        | -   |
| STEP 3 | Add 100 µL of Substrate to each well  |
|        | -   |
|        | Incubate for 15 min. at R.T.  |
|        | -   |
| STEP 4 | Add 100 µL of Stop Solution   |
|        | -   |
|        | Read absorbance at 450 nm within 30 min   |

## **10. TEST VALIDATION**

Subtract the value of the blank ( $\leq 0.150$ ) from all the other readings. The O.D. values of the control Cut-off serum (when performed at least in triplicate) must be within 25% of the mean value. Disregard any abnormal value and recalculate the mean. The Positive control must have an O.D. at least 1.5 times that of the Cut-Off serum. The ratio

between Negative Control and Cut-off must be  $\leq 0.6$ . The O.D. of the Cut-off must be  $\geq 0.2$  at 450 nm and  $\geq 0.16$  at 450/620 nm.

## **11. INTERPRETATION OF THE RESULTS**

### Qualitative results

If the adsorbance of the sample is higher than that of the Cut-off, the sample is positive for the presence of specific IgM.

Calculate the ratio between the O.D. value of the sample and that of the Cut-off (INDEX). The sample is considered:

*Positive:* if the ratio is  $> 1.2$ .

*Doubtful:*  $\pm 20\%$  of the Cut-off.

*Negative:* if the ratio is  $< 0.8$ .

If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, collect a new serum sample.

### Quantitative results

#### Arbitrary Units (AU)

Positive results can be expressed in AU by applying the following formula:

$$\text{AU} = \frac{\text{O.D. sample}}{\text{O.D. Cut-Off}}$$

This ratio is generally considered as an "index" of positivity.

## **12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

The results obtained can only be used as a guide in the diagnosis and must always be evaluated together with results of other diagnostic procedures.

There is a possibility of cross-reactivity with specimens containing anti-E. coli antibodies.

Performance characteristics have not been determined for a visual interpretation, nor have they been evaluated in patients affected by nasopharyngeal carcinoma, Burkitt's lymphoma or other lymphadenopathies associated with EBV, apart from EBV-related mononucleosis.

The diagnosis cannot be established on the basis of a single parameter. An accurate interpretation of an EBV infection must be based on the results of VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG, EA IgG ed EA IgM results, in addition to heterophyle antibodies.

The test must be performed on serum. The use of blood or plasma has not been established.

## **13. ANALYTICAL SPECIFICITY**

10 samples which were negative for anti-EA IgM contained antibodies anti-CMV, anti-Herpes Simplex and anti-Varicella. In no case did the presence of these antibodies interfere with the Enzywell EA IgM kit.

## **14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY**

117 samples were analysed with the Enzywell kit and with another commercial ELISA method.

The results are the following:

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	57	1
	-	2	57

The ENZYWELL method has a sensitivity of 96.6% and specificity of 98.3%.

## **15. PRECISION**

### **"Within run" precision between 3 different lots:**

<i>Cut-off n=15</i>	<i>Lot 014</i>	<i>Lot 015</i>	<i>Lot 016</i>
<i>O.D.</i>	0.464	0.515	0.412
<i>CV%</i>	4	9	6

**“Between run” and “between lots” precision:**

<i>Samples</i>	<i>INDEX</i>			<i>Average</i>	<i>CV%</i>
	<i>Lot 014</i>	<i>Lot 015</i>	<i>Lot 016</i>		
<i>1</i>	<i>0.1</i>	<i>0.07</i>	<i>0.05</i>	<i>0.07</i>	<i>34</i>
<i>2</i>	<i>1.3</i>	<i>1.5</i>	<i>1.3</i>	<i>1.4</i>	<i>8</i>
<i>3</i>	<i>2.5</i>	<i>2.7</i>	<i>2.6</i>	<i>2.6</i>	<i>4</i>

**16. TROUBLE SHOOTING GUIDE**

<b>PROBLEM</b>	<b>POSSIBLE SOURCE</b>	<b>TEST OR ACTION</b>
Invalid run (all negative)	One or more reagents not added or added in wrong sequence	Recheck procedure Check for unused solutions. Repeat test.
	Unreactive plate	Check the code on the package containing the plate (see package insert point 4 for correct code).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel dessiccant must be pale yellow ).Repeat test
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Take new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that wash apparatus works well
Poor precision	Incomplete washing of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Inadequate aspiration of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Reagent addition too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of bubbles	Avoid air bubbles during pipetting.
	Optical pathway not clean	Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft tissue.
Inadequate Color development	Incorrect incubation times or temperature	Check for temperature control and time monitoring
		Adhere to recommended instruction for use.
	Inadequate volume of substrate added to the plate	Check pipette function.

**17. REFERENCES**

1. Gorgievski H.M., Hinderer W. et al. Serodiagnosis of infectious mononucleosis by using recombinant Epstein-Barr virus antigens and enzyme-linked immunosorbent assay technology. J. Clin. Microbiol. 28: 2305 (1990).
2. Middeldorp, J.M. and Herbrink, P. Epstein-Barr virus specific marker molecules for early diagnosis of infectious mononucleosis. J. Virol. Methods 21: 133-146 (1988).
3. Luka, J., Chase, R.C. and Pearson G.R. A sensitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) against the major EBV-associated antigens. I. Correlation between ELISA and immunofluorescence titers using purified antigens. J. Immunol. Methods 67: 145.156 (1984).
4. Motz, M., Fan J., Seibl R., and Wolf H. Expression of the Epstein Barr Virus 138 KDa early protein in E. coli for the use as antigen in diagnostic tests. Gene 42: 303-312 (1986).



## INSTRUCCIONES DE USO

### ENZYWELL EPSTEIN BARR EA IgM

**REF** 91059

(Español)

#### **1. INDICACIONES**

**KIT INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS IgM ANTI-EARLY ANTIGEN DEL EPSTEIN-BARR VIRUS EN SUERO HUMANO COMO UNA AYUDA EN EL DIAGNÓSTICO DEL EPSTEIN BARR**

#### **2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST**

Los antígenos precoces ("Early Antigens") del virus de Epstein Barr (EBV-EA) son proteínas virales fabricadas precozmente en curso de la infección lítica. La determinación de los anticuerpos suéricos anti-EBV-EA por medio de IFA indirecta ha sido por largo tiempo utilizada en unión a la determinación de las IgG e IgM directas hacia los anticuerpos cápsides (VCA) y de las IgG directas hacia un antígeno nuclear (EBNA-1) para la diagnóstico de la mononucleosis infecciosa (IM). De recién se demostró que la determinación por medio de un método inmunoenzimáticos de las IgG e IgM suéricas hacia dos proteínas precoces, la p138 y la p54, está bien correlada con los métodos de IFA indirecta y se puede utilizar, además que como complemento a la determinación de los anticuerpos anti-VCA, también en substitución de estos para la diagnóstico de IM.

El kit para la determinación con método inmunoenzimático de las IgG e IgM anti-EBV-EA utiliza polipéptidos recombinantes fabricados en E. coli conteniendo los anticuerpos de las proteínas p138 y p54.

#### **3. PRINCIPIO DEL MÉTODO**

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay)

Los antígenos recombinantes están unidos a la fase sólida. Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno.

Después de varios lavados para eliminar las proteínas que no han reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos monoclonales humanos anti M marcados con peroxidasa.

El conjugado que no se ha unido es eliminado y se añade el substrato peroxidasa.

El color que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.

#### **4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO**

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.

**Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.**

**MT PLATE** MICROPLACA 1x 96 pocillos recubiertos de proteínas recombinantes de los antígenos precoces de Epstein-Barr Virus.

**Uso:** Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (L, seguido por el número de lote) que sirve para su identificación; retirar el soporte y las tiras necesarias. Colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

**CONJ** CONJUGADO 1x 16 mL

**Contenido:** anticuerpos monoclonales humanos anti IgM marcados con peroxidasa conteniendo fenol al 0.05% y Bronidox al 0.02%. Listo para su uso sin diluciones adicionales.

**CONTROL +** CONTROL POSITIVO 1x 1.6 mL

**Contenido:** Suero humano diluido, a concentración conocida de anticuerpos IgM, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA al 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

**Color:** el color es proporcional al título de los anticuerpos.

**CONTROL CUT-OFF** CONTROL CUT-OFF 1x 2.5 mL

Suero humano diluido, a concentración conocida de anticuerpos IgM, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA al 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

**Color:** el color es proporcional al título del anticuerpo.

**CONTROL IgG -** IgG CONTROL NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

**DEL PANEL EBV REF 91055 VCA IgG, 91056 VCA IgM, 91057 EBNA IgG, 91058 EA IgG, 91059 EA IgM**

**Contenido:** Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA al 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

**WASH BUF 10x** TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

**Contenido:** Solución salina fosfato tamponada (PBS), concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.

**Preparación:** Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir

**SAMP DIL 10** DILUYENTE 10 (PF93621) 1x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

**Contenido:** Solución de proteínas (10%) en tampón fosfato con ázida sódica 0.09% con adición de metilnaranja como conservante.

**SORBENT G** DILUYENTE EBV (PF91083) 1 x 7 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Para la neutralización de las reacciones específicas.

**Contenido:** Solución salina tamponada (PBS) con ázida sódica 0,09% p/v y suero bovino 10%. Listo para su uso.

**SUBS TMB** SUBSTRATO (PF93619) 1x 12 mL Listo para su uso **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

**Contenido:** Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3,8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 mol/L, lista para su uso.

*CINTA ADHESIVA (2).*

*BOLSA DE PLÁSTICO (1).*

**MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS..**

- Incubador a 37°C
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm, con linealidades hasta OD >= 2,000) Lavador de Microplacas (no indispensable) para dispensar volúmenes entre 225-375 µL
- Agua Destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 10, 100, 1000 µL de solución
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel adsorbente.

## **5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS**

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja .

Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la apertura y/o de la preparación

REACTIVO	CONDICIONES
MICROPLACA	5 SEMANAS 2/8°C bolso de plástico
SUEROS DE CONTROL	5 SEMANAS 2/8°C
CONJUGADO	5 SEMANAS 2/8°C
SUBSTRATO	hasta la caducidad a 2/8°C ; 1 semana a 15/30°C; en ambiente oscuro
DILUYENTE MUESTRAS	hasta la caducidad a 2/8°C
SOLUCIÓN DE LAVADO	listo para su uso 2 semanas 2/8°C 5 días a 15/30 °C
SORBENT G	5 semanas 2/8°C
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la caducidad a 2/8°C

## **6. PRECAUCIONES DE USO**

**SOLAMENTE PARA USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO. CONSERVAR A 2-8°C**

**Cuidado:**



*Este kit contiene materiales de origen humano que han sido testados y dieron resultados negativos en las pruebas aprobadas por la FDA para la presencia de HbsAg y de los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-HCV. Dado que ninguna prueba diagnóstica puede ofrecer una completa garantía sobre la ausencia de agentes infecciosos, cualquier material de origen humano debe ser considerado potencialmente infeccioso. Todos los materiales de origen humano deben manipularse según las prácticas de seguridad comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.*

*Desecho de los residuos: las muestras de suero y los reactivos se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, según disposiciones normativas vigentes.*

#### Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por vía oral. Usar los guantes de un solo uso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos a fondo después de terminar el test.
2. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
  - a) El tampón de lavado contiene detergentes
  - b) El conjugado contiene fenol
  - c) El sustrato es ácido
  - d) Los reactivos contienen Ázida Sódica (0.09%) que puede reaccionar con cobre y plomo y formar ázidas metálicas potencialmente explosivas.

Si cualquier reactivo entra en contacto con la piel u ojos, lavar con mucha agua.
3. Los aparatos no desechables se deben esterilizar después su uso. El método preferido es autoclavar durante 1 h a 121°C; los materiales desechables deben ser autoclavados o incinerados.
4. El ácido sulfúrico contenido en la Solución Bloqueante y el ácido clorhídrico usado para limpiar la cristalería son corrosivos; utilizar estos materiales con cuidado. En caso de contacto con la piel u ojos, limpiar con mucha agua.
5. Los ácidos neutralizados y la otros residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1,0%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1,0%, antes de que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada. Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

#### Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta. Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C ó por encima de 39°C.**
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
3. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
4. Lavar con ácido hidroclicórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo.
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" ("efecto filo") que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador. Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO<sub>2</sub>.
10. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
11. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación microbiana.
12. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.
13. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:

- instalación y requisitos específicos
- principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
- especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
- mantenimiento y servicio técnico

## **7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN**

El tipo de muestra es suero recogido normalmente de sangre venosa y manipulado con las apropiadas precauciones requeridas en la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar durante 4 días a 2/8°C. Para conservaciones más largas congelar a -20°C. Se puede descongelar un máximo de 3 veces. Las muestras no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes. Agitar con cuidado las muestras desheladas antes de la titulación. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbica que conduce a resultados erróneos. No utilizar muestras muy lipémicas, ictericas, hemolizadas o contaminadas.

**El test no se puede aplicar el test a plasma humano.**

## **8 PROCEDIMIENTO**

### Método Manual

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo la solución de lavado 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).

Diluir las muestras 1:26 poniendo 40 µL de suero en 1 mL de diluyente. Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla sustrato. Dispensar 50 µL Sorbent G y 50 de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los controles SIN DILUIR en una tira.(100 µL para cada pocillo sin el Sorbent G). El requisito mínimo indispensable es 1 control negativo, 2 cut-off e 1 positivo.

Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 45 minutos a 37°C. Lavar 4 veces, dejando la solución de lavado en el pocillo 30 segundos cada ciclo (300 µL). Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo.

Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante.

Leer la Absorbancia (D.O.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

<b>9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST</b>
--

STEP 1 Poner 50 µL de Sorbent G, 50 µL de suero diluido y 100 µL controles en los pocillos.

-  
Incubar 45 min. a 37°C

-  
Lavar 4 veces (300 µL)

STEP 2 Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo

-  
Incubar 45 min. a 37°C

-  
Lavar 4 veces (300 µL)

STEP 3 Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo

-  
Incubar 15 min. a T.A.

STEP 4 Añadir 100 µL de Solución Bloqueante

-  
Leer la absorbancia a 450 nm dentro de 30 min

## **10. VALIDACIÓN DEL TEST**

Quitar el valor del blanco ( $\leq 0.150$ ) a todas las otras lecturas. Los valores en D.O. del suero de control Cut-off deben ser dentro del 25% del valor medio si testado en triple prueba. Descartar cualquier valor anormal y recalculer la media. El valor positivo debe tener D.O. igual por lo menos a 1.5 veces el Cut-off. La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser  $\leq 0.6$ . La D.O. del cut-off debe ser  $\geq 0,2$  a 450 nm e  $\geq 0,16$  a 450/620 nm.

## **11. INTERPRETACIÓN DEL TEST**

### 1. Resultados cualitativos

Si el valor de la absorbancia de la muestra es superior al Cut-off la muestra resulta positiva por la presencia de IgM específicas para el antígeno.

Calcular la relación entre el valor de D.O. de la muestra y lo del Cut-off (INDEX).

La muestra se considera:

*Inmune*: si la concentración es  $> 1.2$ .

*Dudoso*:  $\pm 20\%$  del cut-off.

*No-inmune*: si la concentración es  $< 0.8$ .

Si el resultado es dudoso, repetir el test. Si el resultado continua siendo dudoso, recoger una nueva muestra de sangre.

## 2. Resultados cuantitativos

Unidades Arbitrarias (AU)

Los resultados positivos se pueden expresar en unidades arbitrarias con esta simple operación:

$$AU = \frac{\text{D.O. Muestra}}{\text{D.O. Cut-off}}$$

Comúnmente esta relación es considerada un valor "index" de positividad.

## 12. LIMITACIONES

El resultado del test sirve sólo como ayuda en la diagnóstico y debe ser evaluado junto con datos procedentes de otros procedimientos de diagnóstico.

Las características de la performance no han sido establecidas para una interpretación visual. Además no se estudiaron en pacientes afectados por carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt ni por otras linfadenopatías asociadas a EBV, excluyendo la mononucleosis correlada a EBV.

No puede ser utilizada para la diagnóstico un único parámetro. La interpretación cuidadosa de una infección por EBV se basa sobre los resultados del VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG, EA IgG ed EA IgM, además que los anticuerpos eterófilos. El test se efectúa sobre el suero. No se estableció todavía la aplicación sobre sangre total ni sobre plasma. Existe la posibilidad de reacciones cruzadas con muestras conteniendo anticuerpos anti-E. coli.

## 13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

10 muestras de pacientes negativos a los anticuerpos IgM I anti-EA que contenían anticuerpos IgM anti-CMV, anti-Herpes Simplex y anti-Varicella. En ningún caso la presencia de dichos anticuerpos interfería con el kit Enzywell EA IgM.

## 14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

117 sueros se analizaron con el kit Enzywell y uno procedente de otro método (ELISA en comercial). Los resultados están resumidos en la tabla siguiente:

		REFERENCIA	
		+	-
DIESSE	+	57	1
	-	2	57

El método Enzywell ofrece una sensibilidad del 96,6% y especificidad del 98,3%.

## 15. PRECISIÓN

**Precisión intra-ensayo ejecutada sobre 3 lotes distintos:**

<i>Cut-off n=15</i>	<i>Lote 014</i>	<i>Lote 015</i>	<i>Lote 016</i>
<i>D.O.</i>	0.464	0.515	0.412
<i>CV%</i>	4	9	6

**Precisión en series y lotes distintos:**

<i>Muestra</i>	<i>INDEX</i>			<i>Media</i>	<i>CV%</i>
	<i>Lote 014</i>	<i>Lote 015</i>	<i>Lote 016</i>		
<i>1</i>	<i>0.1</i>	<i>0.07</i>	<i>0.05</i>	<i>0.07</i>	<i>34</i>
<i>2</i>	<i>1.3</i>	<i>1.5</i>	<i>1.3</i>	<i>1.4</i>	<i>8</i>
<i>3</i>	<i>2.5</i>	<i>2.7</i>	<i>2.6</i>	<i>2.6</i>	<i>4</i>

**16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS**

<b>PROBLEMA</b>	<b>POSSIBLES FUENTES DE ERROR</b>	<b>PRUEBA U ACCIONES</b>
Serie no válida (todos negativos)	Uno o más reactivos no han sido añadidos o han sido añadidos en secuencia errónea .	Controlar de nuevo el procedimiento Controlar si hay disoluciones que no se hayan utilizado.
	Placa no reactiva	Controlar el código del envase de la placa (ver punto 4 de la información técnica para el código correcto).
		Controlar la presencia de humedad en la placa no utilizada. (El gel de sílice debe ser amarillo pálido) Repetir el test.
Serie no válida (todos positivos)	Contaminación del sustrato	Recoger una nueva alícuota de sustrato.
	Lavado inadecuado	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
Escasa precisión	Aspiración incompleta de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Aspiración inadecuada de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Error de pipeteado	Controlar el funcionamiento de la pipeta
	Adición de los reactivos demasiado lenta	Evitar la sequedad de la placa después del lavado. Añadir los reactivos inmediatamente.
	Presencia de burbujas	Evitar la formación de burbujas mientras se pipetea
	Sistema óptico no limpio	Controlar la fuente de luz y el detector para la presencia de suciedad . Limpiar el fondo de la placa con papel suave.
Desarrollo escaso del color	Tiempo o temperatura de incubación incorrectos	Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.
		Seguir cuidadosamente las instrucciones.
	Volumen inadecuado de sustrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

**17. BIBLIOGRAFÍA**

1. Gorgievski H.M., Hinderer W. et al. Serodiagnosis of infectious mononucleosis by using recombinant Epstein-Barr virus antigens and enzyme-linked immunosorbent assay technology. J. Clin. Microbiol. 28: 2305 (1990).
2. Middeldorp, J.M. and Herbrink, P. Epstein-Barr virus specific marker molecules for early diagnosis of infectious mononucleosis. J. Virol. Methods 21: 133-146 (1988).
3. Luka, J., Chase, R.C. and Pearson G.R. A sensitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) against the major EBV-associated antigens. I. Correlation between ELISA and immunofluorescence titers using purified antigens. J. Immunol. Methods 67: 145.156 (1984).
4. Motz, M., Fan J., Seibl R., and Wolf H. Expression of the Epstein Barr Virus 138 KDa early protein in E. coli for the use as antigen in diagnostic tests. Gene 42: 303-312 (1986).



## INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

### ENZYWELL EPSTEIN BARR EA IgM

**REF** 91059

(Português)

#### 1. UTILIZAÇÃO PREVISTA

O IgM Enzywell Epstein Barr EA é um método imuno-enzimático para a determinação qualitativa dos anticorpos de classe IgM ao anticorpo precoce do vírus Epstein Barr no soro humano como uma ajuda no diagnóstico de Epstein Barr.

#### 2. RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Os antígenos precoces Epstein Barr (EBV-EA) são proteínas virais produzidas nas fases iniciais da infecção lítica. No diagnóstico da mononucleose infecciosa (IM), a imunofluorescência indirecta foi adoptada durante muito tempo para a determinação dos anticorpos do soro contra EBV-EA, em associação à detecção de IgG e IgM contra antígenos cápsidos (VCA) e IgG contra um antígeno nuclear (EBNA-1). Recentemente, demonstrou-se que a determinação imuno-enzimática de soro IgG e IgM contra as duas proteínas precoces, p138 e p54, mostra uma boa relação com o método de imunofluorescência indirecta e pode ser utilizado, não só como método complementar na determinação de anticorpos anti-VCA, mas também como substituto para estes métodos no diagnóstico de IM.

O Kit Enzywell para a determinação imuno-enzimática de IgG e IgM anti-EBV-EA usa polipéptidos recombinantes produzidos nos epitopos contendo E. coli das proteínas p138 e p54.

#### 3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O teste é baseado na técnica ELISA (Ensaio de imuno-absorção enzimática).

Os antígenos recombinantes ligam-se à fase sólida. As imunoglobulinas específicas são ligadas ao antígeno a seguir à incubação com soro humano diluído.

Após as lavagens para eliminar as proteínas que não reagiram, a incubação é efectuada com conjugado, composto de anticorpos IgG humanos monoclonais marcados com peroxidase.

O conjugado desligado é eliminado e o substrato de peroxidase é adicionado.

A cor que se desenvolve é proporcional à concentração de anticorpos específicos presentes na amostra de soro.

#### 4. CONTEÚDO DO KIT

Os reagentes são suficientes para 96 determinações.

**- Ponha à temperatura ambiente antes da utilização.**

**MT PLATE** MICROPLACA 1 x 96 poços revestidos com proteínas EA recombinantes.

Utilização: abra a embalagem no lado oposto ao código (L, seguido do número do lote), que é útil para a sua identificação, retire o suporte e as tiras da embalagem folheada para serem usadas e coloque as tiras não usadas no saco de polietileno com sílica gel, retire o ar e vede premindo o fecho.

**CONJ** CONJUGADO 1x16 mL

Conteúdo: anticorpos monoclonais IgM anti-humanos marcados com Peroxidase, numa solução tampão fosfatada contendo fenol a 0,05% e Bronidox a 0,02%.

Preparação: pronto a usar.

**CONTROL +** CONTROLO POSITIVO 1 x 1.6 mL

Conteúdo: Soro humano na concentração conhecida de anticorpos IgM anti-EA, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com BSA a 1% e azida de sódio a 0,09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao respectivo título dos anticorpos.

**CONTROL CUT-OFF** CONTROLO DIRECTO 1 x 2.5 mL

Conteúdo: Soro humano na concentração conhecida de anticorpos IgM anti-EA, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com BSA a 1% e azida de sódio a 0,09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao respectivo título dos anticorpos.

**CONTROL IgG** - IgG CONTROLO NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES DO PANEL EBV REF 91055 VCA IgG, 91056 VCA IgM, 91057 EBNA IgG, 91058 EA IgG, 91059 EA IgM**

**Conteúdo:** Soro humano, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com BSA a 1% e azida de sódio a 0,09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

**SUBS TMB** SUBSTRATO (PF93619) 1x 12 mL Pronto a usar. **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

**Conteúdo:** Tetrametilbenzidina a 0,26 mg/mL e peróxido de hidrogénio a 0.01% estabilizado num tampão de citrato a 0,05 mol/L (pH 3.8).

**SAMP DIL 10** DILUENTE 10 (PF93621). 1x 100 mL. Para diluição de amostras de soro. **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

**Conteúdo:** Solução proteica em tampão fosfatado com azida de sódio a 0,09% adicionado de metil-orange como corante .

**Preparação:** Pronto a usar.

**WASH BUF 10X** TAMPÃO DE LAVAGEM 10x (PF93603) 1 x 100 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

**Conteúdo:** Tampão fosfatado salino, concentrado 10 vezes, contendo Brij a 0,5% .

**Preparação:** dilua o volume necessário na proporção de 1:10 com água destilada para obter o tampão de lavagem pronto a ser usado. Se houver cristais, estes devem ser dissolvidos a 37°C antes da diluição.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602) 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 mol/L, em solução pronta a ser usada.

**SORBENT G** DILUENTE EBV (PF91083) 1 x 7 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

A colocar nos poços para neutralizar reacções não específicas.

**Conteúdo:** Tampão fosfatado salino (PBS) contendo azida de sódio a 0,09% e soro bovino a 10% w/v. Pronto a usar.

*PELÍCULAS ADESIVAS (2).*

*SACO DE POLIETILENO (1).*

## MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Incubador a 37°C
- Leitor de microplacas, comprimento de onda 450 ou 450/620 nm e 405 nm, com uma linearidade da DO até 2000 (no mínimo).
- Sistema de lavagem de microplacas (preferível) capaz de fornecer volumes entre 225-375 µL
- Água destilada ou desionizada.
- Recipientes de vidro normais para laboratório: cilindros, tubos de teste, etc.
- Micropipetas e pontas (10, 100, 1000 µL) com uma precisão de ± 2%
- Luvas descartáveis
- Temporizador
- Solução de hipoclorito de sódio (5%)
- Recipientes para colheita de materiais potencialmente infecciosos
- Lenço absorvente.

## 5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE APÓS A PRIMEIRA ABERTURA

Os reagentes devem ser mantidos a 2/8°C.

O prazo de validade está impresso em cada componente e no rótulo da embalagem.

### Os reagentes têm uma estabilidade limitada após abertura e/ou preparação

#### CONDIÇÕES

Microplaca	5 semanas a 2/8°C, saco de polietileno
Soros de controlo	5 semanas a 2/8°C
Conjugado	5 semanas a 2/8°C
Substrato	até ao prazo de validade a 2/8°C, 1 semana a 15-30°C, guarde ao abrigo da luz
Diluyente de amostras	até ao prazo de validade a 2/8°C
Tampão de lavagem	2 semanas a 2/8°C, 5 dias a 15/30°C.
Sorvente	5 semanas a 2/8°C
Solução de paragem	até ao prazo de validade a 2/8°C

## 6. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES 7.1 PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

Para uso diagnóstico in vitro.

Este kit contém materiais de origem humana que foram testados e deram uma resposta negativa por métodos aprovados pela FDA à presença de HbsAg e de anticorpos anti-HIV1, anti-HIV2 e anti-HVC. Dado que nenhum teste de diagnóstico poderá dar uma leitura completa no que respeita a agentes infecciosos, todo o material de origem humana deve ser manuseado como potencialmente infeccioso. Todas as precauções normalmente adoptadas na prática de laboratório devem ser seguidas quando manusear material de origem humana.

*Eliminação de resíduos: as amostras de soro e os reagentes utilizadas devem ser tratados como resíduos infecciosos e portanto, eliminados em conformidade com as disposições legais aplicáveis.*

- Não utilize a boca na pipetagem. Utilize luvas descartáveis e protecção para os olhos quando manusear amostras e executar o ensaio. Lave bem as mãos quando tiver terminado.
- Os seguintes reagentes contêm baixas concentrações de substâncias nocivas ou irritantes.
  - e) O tampão de lavagem contêm detergentes
  - f) O conjugado e os controlos contêm fenol
  - g) O substrato é ácido
  - h) Os controlos contêm azida de sódio a 0,09% que pode reagir com chumbo e cobre nos canos e formar depósitos altamente explosivos de azidas metálicas.

Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou os olhos, lave a área com água abundante.

- Aparelhos não descartáveis devem ser esterilizados após a utilização. O método preferido é a autoclave para 1 hora a 121°C; os descartáveis devem ser colocados em autoclave ou incinerados.
- O ácido sulfúrico necessário para a solução de paragem e o ácido hidrolórico usado na lavagem de recipientes de vidros são corrosivos e devem ser manuseados com atenção apropriada. Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou os olhos, lave a área com água abundante.
- Ácidos neutralizados e outros líquidos dispensáveis devem ser descontaminados juntando um volume suficiente de hipoclorito de sódio para obter uma concentração final de pelo menos 1.0%. Uma exposição de 30 minutos a hipoclorito de sódio a 1% pode ser necessária para assegurar uma descontaminação efectiva.
- Salpicos de materiais potencialmente infecciosos devem ser removidos imediatamente com um lenço de papel absorvente e a área contaminada esfregada com hipoclorito de sódio a 1,0%, por exemplo, antes do trabalho continuar. O hipoclorito de sódio não deve ser usado em salpicos que contenham ácidos, excepto se a área salpicada for primeiro seca. Os materiais usados para limpar salpicos, incluindo as luvas, devem ser descartados como lixo biológico potencialmente perigoso. Não coloque em autoclave materiais que contenham hipoclorito de sódio.

### PRECAUÇÕES TÉCNICAS

- **Conserve a 2-8°C**
- Aguarde que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (18-30°C) antes da utilização. Reponha imediatamente os reagentes à temperatura recomendada para armazenamento após utilização. **É importante trabalhar à temperatura correcta. Certifique-se de que o termóstato não desce abaixo de 35°C nem sobe acima de 39°C.**
- Abra o saco contendo as tiras pelo menos após 30 minutos à temperatura ambiente.
- Não utilize reagentes além do prazo de validade indicado. Deve evitar-se a contaminação microbiológica de reagentes, dado que poderá reduzir a duração do produto e provocar resultados errados.
- Não modifique o procedimento de teste nem substitua reagentes por outros de outros fabricantes ou outros lotes de reagente, a menos que estejam indicados como intermutáveis. Não reduza nenhum dos tempos recomendados para incubação.
- Qualquer recipiente de vidro a ser usado com os reagentes deve ser lavado profusamente com ácido hidrolórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada de alta qualidade.
- Evite a utilização de congeladores auto-descongeláveis para armazenamento de amostras.
- Não exponha os reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.
- Não deixe que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.
- Tenha cuidado para que não haja contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com os vários reagentes.
- Tenha cuidado para evitar tocar ou salpicar a borda do poço com o conjugado. Não "sobre" as microplacas.
- Os ensaios de imuno-enzimas podem exibir ocasionalmente um "efeito de margem" que deve ser minimizado aumentando a humidade durante os passos de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e

incubadas a 37°C num banho de água com um rack ou uma bóia para suportar as placas, se necessário, ou num incubador. Em alternativa, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Para mais informações, consulte o manual de instruções apropriado. Os incubadores de CO<sub>2</sub> não devem ser utilizados.

- Certifique-se de que a parte inferior da placa está limpa e seca e que não existem bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa.
- A utilização de amostras altamente hemolizadas, soros incompletamente coagulados ou amostras com contaminação microbiana pode dar origem a resultados erróneos.
- O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado por o usuário.
- Para cada instrumento utilizado, leia atentamente o manual de instruções do fabricante para obter informações adicionais sobre os seguintes pontos:
  - instalação e requisitos particulares
  - princípios de operação, instruções, precauções e riscos
  - especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
  - manutenção e reparação

## 7. COLHEITA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

A amostra é composta por soro recolhido de maneira normal numa veia e manuseado com todas as precauções ditas pelas boas práticas laboratoriais. O soro fresco pode ser guardado durante 4 dias a 2/8°C ou congelado por períodos mais longos a -20°C e pode ser descongelado um máximo de três vezes. Evite a utilização de congeladores autodescongeláveis para armazenamento de amostras. Amostras descongeladas devem ser cuidadosamente misturadas antes de efectuar o teste. A inactivação de calor pode levar a resultados erróneos. A qualidade da amostra pode ser seriamente afectada por contaminação microbiana que leve a resultados erróneos.

Devem evitar-se amostras fortemente lipémicas, contaminadas ou ictéricas. **O teste não é aplicável ao plasma humano.**

## 8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Prepare a quantidade necessária de tiras
- Prepare o tampão de lavagem diluindo-o 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).

## PASSOS DA PIPETAGEM E INCUBAÇÃO

Amostras diluídas na proporção de 1:26 distribuindo 40 µL de soro em 1mL de diluente. Deixe um poço para o branco, executado com a utilização de 100 µL da mistura de substrato e 100 µL da solução de paragem. Distribua 100 µL de Sorvente G e 50 µL de cada amostra diluída por poço (recomendam-se testes duplicados). Coloque os controlos NÃO DILUÍDOS numa tira (100 µL em cada poço sem o Sorvente G). O requisito mínimo é 1 controlo negativo, 2 directos e 1 positivo.

Os poços são cobertos com filme protector e incubados durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar quatro vezes durante 30 segundos (300 µL), junte 100 µL de conjugado a cada poço e deixe incubar mais uma vez durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com filme protector. A placa é lavada mais 4 vezes, como descrito acima. Finalmente, o substrato é distribuído, 100 µL/poço.

Após 15 minutos à temperatura ambiente, a reacção enzimática é parada com 100 µL de solução de paragem.

A adsorção (O.D.) é lida a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min.

<b>9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE</b>
--

Deixe o primeiro poço vazio para o branco (A1).

- A. Pipete 100 µL de controlos não diluídos nos poços designados
- B. Nos poços subsequentes, pipete 50 µL de Sorvente G e 50 µL de amostras diluídas (1:26)
- C. Incube durante 45 minutos a 37°C
- D. Lave 4 vezes (300 µL)
- E. Adicione 100 µL de conjugado em cada poço (à excepção do poço A1)
- F. Incube durante 45 minutos a 37°C
- G. Lave 4 vezes (300 µL)
- H. Adicione 100 µL de substrato a cada poço (incluindo o poço A1)
- I. Incube durante 15 minutos à temperatura ambiente
- J. Adicione 100 µL de solução de paragem (incluindo o poço A1)
- K. Leia a absorvência a 450 nm dentro de 30 min.

## 10. VALIDADE DO ENSAIO

A D.O. do branco deve ser <= 0,150.



Subtraia o valor do branco de todas as outras leituras. Os valores D.O. do soro de controlo directo (quando testados pelo menos em triplicado) devem estar dentro do valor médio de 25%. Ignore qualquer valor anormal e volte a calcular a média. O controlo positivo deve ter uma D.O. de pelo menos 1,5 vezes a do soro directo. A relação entre Controlo Negativo e Directo deve ser  $\leq 0,6$ . O valor de D.O. do directo deve ser  $\geq 0,2$  a 450 nm e  $\geq 0,16$  a 450/620 nm.

### 11. RESULTADOS QUALITATIVOS

Subtraia a D.O. do branco de todas as leituras para obter DOS líquidas.

Se a adsorção da amostra for maior que a de controlo, a amostra é positiva para a presença de IgM específico.

Calcule a relação entre o valor DO da amostra e a do valor directo. Esta relação é o Índice Directo (COI). A amostra é considerada:

*Positiva:* se o COI for  $> 1,2$ .

*Duvidosa:* se o COI estiver entre 0,8-1,2 (Directo  $\pm 20\%$ ).

*Negativa:* se o COI for  $< 0,8$ .

se o resultado for duvidoso, repita o teste. Se permanecer duvidoso, recolha uma nova amostra de soro.

### 12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Os resultados obtidos só podem ser usados como guia no diagnóstico e devem ser sempre avaliados juntamente com os resultados de outros procedimentos de diagnóstico.

Existe a possibilidade de reacções cruzadas com amostras contendo anticorpos anti-E. coli.

As características de desempenho não foram determinadas para uma interpretação visual, nem foram avaliadas em pacientes afectados por carcinoma de nasofaringe, linfoma de Burkitt ou outras linfadenopatias associadas a EBV, para além de mononucleose relacionada com EBV.

O diagnóstico não pode ser estabelecido com base num único parâmetro. Uma interpretação exacta de uma infecção EBV deve basear-se nos resultados de VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG, EA IgG e EA IgM, para além dos anticorpos heterofílicos.

O teste deve ser executado em soro. A utilização de sangue ou plasma não foi estabelecida.

### 13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

10 amostras que estavam negativas para IgM anti-EA continham anticorpos anti-CMV, anti-Herpes Simplex e anti-Varicela. Em nenhum caso a presença destes anticorpos interfere com o Kit Enzywell EA IgM.

### 14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE RELATIVA

117 amostras foram analisadas com o kit Enzywell e por outro método ELISA comercial:

Os resultados são os seguintes:

		REFERÊNCIA	
		+	-
Enzywell	+	57	1
	-	2	57

O método Enzywell tem uma sensibilidade de 96,6% e uma especificidade de 98,3%.

### 15. PRECISÃO

**Precisão intra-ensaios efectuada em 3 lotes diferentes:**

Valor directo n=15	Lote 014	Lote 015	Lote 016
D.O.	0,464	0,515	0,412
CV%	4	9	6

**Precisão entre testes e entre lotes:**

	<b>ÍNDICE DIRECTO</b>				
<b>Amostras</b>	<b>Lote 014</b>	<b>Lote 015</b>	<b>Lote 016</b>	<b>Média</b>	<b>CV%</b>
<b>1</b>	0,1	0,07	0,05	0,07	34
<b>2</b>	1,3	1,5	1,3	1,4	8
<b>3</b>	2,5	2,7	2,6	2,6	4










## 16. SUGESTÕES PARA RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

O cumprimento do procedimento e das especificações do ensaio, bem como uma utilização correcta dos reagentes e uma pipetagem adequada, ajudará a evitar os seguintes erros.

<b>PROBLEMA</b>	<b>POSSÍVEIS CAUSAS</b>	<b>TESTE OU ACÇÃO</b>
Passagem inválida (todos negativos)	Um ou mais reagentes não foram adicionados ou estão na sequência incorrecta	Verifique o procedimento Verifique se existem soluções não usadas. Repita o teste
	Placa não reactiva	Verifique o código na embalagem que contém a placa (ver o código correcto no folheto da embalagem).
		Verifique a existência de humidade na placa não utilizada. (O dessecante de sílica gel deve estar amarelo pálido). Repita o teste
Passagem inválida (todos positivos)	Contaminação do substrato	Obtenha nova aliquota de substrato.
	Lavagem inadequada	Certifique-se de que o aparelho de lavagem funciona bem
Pouca precisão	Lavagem incompleta de poços	Certifique-se de que o aparelho de lavagem funciona bem
	Aspiração inadequada de poços	Certifique-se de que o aparelho de lavagem funciona bem
	Erro de pipetagem	Verifique a função de pipetagem
	A adição de reagente é muito lenta	Evite a secagem da placa após o passo de lavagem. Adicione os reagentes imediatamente
	Presença de bolhas	Evite bolhas de ar durante a pipetagem.
	A passagem óptica não está limpa	Verifique se o instrumento luminoso e o detector têm sujidade. Limpe a parte inferior da placa com um pano suave.
Desenvolvimento inadequado de cor.	Tempos ou temperatura de incubação inadequados	Verifique o controlo de temperatura e a monitorização do tempo.
		Observe as instruções de utilização recomendadas.
	Volume inadequado do substrato adicionado à placa	Verifique a função de pipetagem

## 17. REFERÊNCIAS

1. Gorgievski H.M., Hinderer W. et al. Serodiagnosis of infectious mononucleosis by using recombinant Epstein-Barr virus antigens and enzyme-linked immunosorbent assay technology. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2305 (1990).
2. Middeldorp, J.M. and Herbrink, P. Epstein-Barr virus specific marker molecules for early diagnosis of infectious mononucleosis. *J. Virol. Methods* 21: 133-146 (1988).
3. Luka, J., Chase, R.C. and Pearson G.R. A sensitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) against the major EBV-associated antigens. I. Correlation between ELISA and immunofluorescence titers using purified antigens. *J. Immunol. Methods* 67: 145-156 (1984).
4. Motz, M., Fan J., Seibl R., and Wolf H. Expression of the Epstein Barr Virus 138 KDa early protein in *E. coli* for the use as antigen in diagnostic tests. *Gene* 42: 303-312 (1986).

	EN ES IT	Date of manufacture Fecha de fabricación Data di fabbricazione	FR GR PT	Date de fabrication Ημερομηνία Παραγωγής Data de fabrico
	EN ES IT	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro	FR GR PT	Utiliser jusque Ημερομηνία λήξης Prazo de validade
	EN ES IT	Caution, consult accompanying documents Atención, ver instrucciones de uso Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Attention voir notice d'instructions Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída
	EN ES IT	Manufacturer Fabricante Fabbricante	FR GR PT	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante
	EN ES IT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR GR PT	Contenu suffisant pour "n" tests Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Conteúdo suficiente para "n" ensaios
	EN ES IT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura	FR GR PT	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura
	EN ES IT	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização
	EN ES IT	Biological risks Riesgo biológico Rischio biologico	FR GR PT	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico
	EN ES IT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo	FR GR PT	Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo
	EN ES IT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR GR PT	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	EN ES IT	Batch code Código de lote Codice del lotto	FR GR PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote



**DIESSE Diagnostica Senese**  
**Via delle Rose 10**  
**53035 Monteriggioni (Siena) Italy**  
**Tel. 0577-587111**