

ENZY-WELL



**Epstein-Barr EBNA
IgG**

DIESSE Diagnostica Senese
S.p.A.
Via delle Rose, 10
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy

REF 91057





ENZY-WELL Epstein-Barr EBNA IgG

**Per la determinazione qualitativa degli anticorpi
IgG anti-Epstein-Barr Nuclear Antigen (EBNA)**

Solo per uso diagnostico in vitro

1. UTILIZZAZIONE

Metodo immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi di classe IgG anti-Epstein-Barr Nuclear Antigen (EBNA) nel siero umano.

2. INTRODUZIONE

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è un herpesvirus che causa la mononucleosi infettiva (IM). E' inoltre associato al linfoma di Burkitt, al carcinoma nasofaringeo e a sindromi linfoproliferative negli immunodepressi. Il virus è diffuso in tutto il mondo e l'80-90% della popolazione risulta sieropositiva.

La diagnosi di laboratorio di IM viene tradizionalmente fatta rivelando la presenza nel siero di anticorpi eterofili agglutinanti i globuli rossi di cavallo, che si sviluppano nel corso della malattia. Tuttavia tali anticorpi possono non essere presenti in soggetti con IM, specialmente al di sotto di 14 anni ed inoltre, possono persistere per oltre un anno dopo l'infezione. La sola ricerca di anticorpi eterofili può perciò portare ad una diagnosi errata.

E' perciò importante la ricerca di anticorpi diretti verso antigeni virali. In particolare si rivela utile la ricerca di anticorpi diretti verso il complesso antigenico denominato "Viral Capsid Antigen" (VCA) e l'antigene nucleare (EBNA).

Nel corso di IM gli anticorpi IgM e IgG anti-VCA compaiono precocemente, mentre gli anticorpi IgG anti-EBNA si sviluppano più tardi. Perciò la presenza di IgM anti-VCA in assenza di IgG anti-EBNA indica infezione in corso, mentre la presenza di IgG anti-VCA e anti-EBNA indirizza verso una diagnosi di infezione pregressa.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). L'antigene viene legato alla fase solida. Le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene in seguito ad incubazione con siero umano diluito. Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti-IgG umane coniugati con perossidasi di rafano. Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi. Il colore blu che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame.

Quando la reazione enzimatica è interrotta per aggiunta di una soluzione di acido solforico, la colorazione diventa gialla. Il

colore, proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel siero, può essere letto in un lettore per micropiastre.

4. PRECAUZIONI

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.
2. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova.
3. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
4. In merito alle caratteristiche di sicurezza dei reagenti contenuti nel kit consultare la Scheda di Sicurezza (disponibile su richiesta).
5. Le apparecchiature non monouso devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1 h a 121°C; tutte le apparecchiature monouso devono essere smaltite secondo le norme vigenti.
6. L'acido cloridrico 2M 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.
7. 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.
8. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere decontaminata, 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 decontaminare eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. La D.O. del Cut-Off, dei controlli e dei campioni può essere leggermente diversa fra piastre diverse. Quindi, se si utilizzano nella stessa seduta delle strips da piastre diverse, anche se dello stesso lotto, è necessario ripetere la determinazione del Cut-Off.
2. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti 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.**
3. Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
4. 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.
5. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o di altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
6. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
7. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
8. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
9. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni.
10. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. È importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso con il substrato e con il coniugato.
11. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato.
12. Non soffiare sulle micropiastre.
13. 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 CO₂.
14. 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.
15. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, lipemici, itterici, di siero non completamente coagulato o di campioni che presentano inquinamento microbico.
16. Evitare la contaminazione dei pozzetti con la polvere da guanti monouso.
17. L'utilizzo del kit con strumenti automatici deve essere validato da parte dell'utilizzatore.

18. Leggere il Manuale Utente 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.

5. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni

Portare i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso.

MT PLATE MICROPIASTRA 12x8 (PF 93071)

Contenuto: 1 piastra da 96 pozzetti sensibilizzati con antigene EBNA ricombinante

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta del codice (E seguito dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto e le strips necessarie. Riporre le altre non utilizzate nella busta di polietilene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

CONJ CONIUGATO 1x16 mL (PF 93509)

Contenuto: anticorpi monoclonali anti-IgG umane marcati con perossidasi in tampone fosfato con fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%. Liquido, pronto all'uso.

CONTROL IgG - IgG CONTROLLO NEGATIVO 1x 1.6 mL (PF93910)

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, non contenente anticorpi IgG anti-EBNA, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e Sodio Azide 0.09%. Liquido, pronto all'uso.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1x1.6 mL (PF 92073)

Contenuto: Siero umano contenente anticorpi IgG anti-EBNA, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e Sodio Azide 0.09%. Liquido, pronto all'uso.

CONTROL CUT-OFF CONTROLLO CUT-OFF 1x 2 mL (PF 91873)

Contenuto: Siero umano contenente anticorpi IgG anti-EBNA, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e Sodio Azide 0.09%. Liquido, pronto all'uso.

SAMP DIL 10 DILUENTE 10 1x100 mL (PF93621)

INTERCAMBIABILE FRA LOTTI
Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) contenente proteine 10%, con Sodio Azide 0.09% e colorante (metilarancio).

Uso: Da utilizzare per la diluizione dei campioni. Liquido, pronto all'uso.

SORBENT G DILUENTE EBV 1x7 mL (PF91083)

INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) con Sodio Azide 0.09% e siero bovino 10%.

Uso: Da utilizzare per la diluizione dei campioni (nel pozzetto). Liquido, pronto all'uso.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10x 1x100 mL (PF93603)

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 o deionizzata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

SUBS TMB SUBSTRATO 1x12 mL (PF93619)

INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL e H₂O₂ 0.01% stabilizzati in tampone citrato 0.05 mol/L (pH 3.8). Liquido, pronto all'uso.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE 1x16 mL (PF93602)

INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Soluzione di H₂SO₄ 0.3 mol/L. Liquido, pronto all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO.

- Incubatore a 37-40 °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
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µl di soluzione
- Guanti monouso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

6. 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:

MICROPIASTRA	8 settimane a 2-8°C in busta di polietilene
CONIUGATO	8 settimane a 2-8°C
CONTROLLO POSITIVO	8 settimane a 2-8°C
CONTROLLO IgG NEGATIVO	fino alla scadenza a 2-8°C
CONTROLLO CUT-OFF	8 settimane a 2-8°C
DILUENTE 10	fino alla scadenza a 2-8°C
SORBENT G	5 settimane a 2-8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2-8°C; 1 settimana a 15-30°C; conservare al buio
TAMPONE DI LAVAGGIO	2 settimane a 2-8°C; 5 giorni a 15-30°C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2-8°C

7. TIPO DI CAMPIONI E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato come richiesto nelle procedure standard di laboratorio.

Non sono conosciute le conseguenze dell'utilizzo di altri liquidi biologici.

Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C; per periodi di conservazione maggiori, congelare a -20°C.

Il campione può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. Dopo lo scongelamento agitare con cura il campione prima del dosaggio.

L'inattivazione al calore può fornire risultati erronei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erronei.

8. PROCEDIMENTO

PREPARAZIONE

Prima dell'inizio del test, portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (18-30°C).

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Diluire i campioni 1:26 dispensando 40 µL di siero in 1 mL di diluente.

ESECUZIONE DEL TEST

1. Distribuzione dei campioni:
Dispensare 50 µl di Sorbent G per pozzetto e 50 µl di campione diluito (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato).
Dispensare 100 µl di controllo (positivo, negativo o cut-off) per pozzetto.
Il requisito minimo indispensabile è di 1 controllo negativo, 1 controllo positivo e 2 controlli Cut-Off. Lasciare un pozzetto della strip per il bianco (100 µL di substrato).
2. Incubazione:
Incubare la piastra coperta con foglio adesivo a 37°C per 45 minuti.
3. Lavaggio:

Rimuovere il foglio adesivo, aspirare il contenuto di tutti i pozzetti e lavare 4 volte riempiendo ciascun pozzetto con 300 µL di soluzione di lavaggio. Attendere 30 secondi prima di ogni lavaggio.

4. Distribuzione del coniugato:
Dispensare 100 µL di coniugato per ciascun pozzetto della piastra.
5. Incubazione del coniugato:
Incubare la piastra coperta con foglio adesivo a 37°C per 45 minuti.
6. Lavaggio:
Rimuovere il foglio adesivo, aspirare il contenuto di tutti i pozzetti e lavare 4 volte riempiendo ciascun pozzetto con 300 µL di soluzione di lavaggio. Attendere 30 secondi prima di ogni lavaggio.
7. Distribuzione del substrato:
Dispensare 100 µL di substrato per ciascun pozzetto della piastra.
8. Incubazione del substrato:
Incubare la piastra a temperatura ambiente per 15 minuti.
9. Arresto della reazione:
Dispensare 100 µL di soluzione bloccante seguendo lo stesso ordine di aggiunta del punto 4.
10. Lettura:
Leggere le D.O. a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min. Rileggere a 405 nm se ci sono D.O. superiori a 2.000.

9. SCHEMA DEL SAGGIO PER EBNA IgG

- STEP 1 Mettere 50 µL di Sorbent G e 50 µL di siero diluito. Mettere 100 µL di tutti i controlli (positivo, negativo e cut-off) nei pozzetti dello strip. Agitare.
- 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 la D.O. a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Togliere il valore del bianco ($< = 0.100$) a tutte le altre letture.

Controllo negativo: Il rapporto tra la D.O. del controllo negativo e la D.O. del cut-off deve essere $< = 0.6$.

Controllo positivo: il controllo positivo deve avere una D.O. di almeno 1.5 volte quella del siero cut-off.

Controllo cut-off: la D.O. del cut-off deve essere ≥ 0.200 .

Se uno dei risultati dei sieri di controllo non rientra nell'intervallo di accettabilità, ripetere il test. Se il problema persiste contattare il Scientific Support.

Tel: 0039 0577 587121

Fax: 0039 0577 587122

email: scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Calcolare il rapporto fra il valore della D.O. del campione e quello del Cut-Off (Index).

Il campione sarà giudicato:

POSITIVO: quando l'Index è > 1.2

DUBBIO: per tutti i valori $0.8 - 1.2$

NEGATIVO: quando l'Index è < 0.8

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

12. LIMITAZIONI

Tutti i valori ottenuti necessitano di un'attenta interpretazione che non prescinda da altri indicatori relativi allo stesso paziente. Il test, infatti, non può essere utilizzato da solo per una diagnosi clinica ed il risultato ottenuto deve sempre essere valutato insieme a dati provenienti dall'anamnesi del paziente e/o da altre indagini diagnostiche.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

10 campioni negativi agli anticorpi IgG anti-EBNA e anti-VCA sono stati testati per la determinazione delle IgG anti-CMV, anti-Herpes Simplex e anti-Varicella. In nessun caso la presenza di detti anticorpi interferiva con il kit Enzywell EBNA IgG.

14. STUDI DI COMPARAZIONE

In una sperimentazione sono stati analizzati 88 campioni con il kit Diesse e con un altro kit del commercio.

Di seguito sono schematizzati i dati della sperimentazione:

		Riferimento		
		+	-	Totale
Diesse	+	44	1	45
	-	0	43	43
	Totale	44	44	88

Percent Positive Agreement (~Sensibilità Diagnostica):

100% CI_{95%}: 92.0-99.9.

Percent Negative Agreement (~Specificità Diagnostica):

97.7% CI_{95%}: 88.1.-99.6

15. PRECISIONE E RIPETIBILITA'

Precisione all'interno della seduta eseguita su 3 lotti diversi

Cut-off n=15	Lotto 011	Lotto 012	Lotto 013
D.O.	0.447	0.498	0.388
CV%	5	8	6

Precisione tra sedute e tra lotti

Campione	INDEX				
	Lotto 011	Lotto 012	Lotto 013	Media	CV%
EBN 1	0.27	0.26	0.18	0.24	21
EBN 2	1.10	1.17	1.24	1.17	6
EBN 3	2.11	2.46	2.21	2.26	8

16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBILI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
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).
		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	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
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

17. BIBLIOGRAFIA

1. A. Andersson, V. Vetter et al. Avidities of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr Virus serology. *J. Med. Virology* 43: 238 (1994).
2. J. Middeldorp and P. Herbrink: Epstein Barr Virus specific marker molecules for early diagnosis of infectious mononucleosis. *J. Virol. Methods* 21: 133 (1988).
3. C. Valent Sumaya: Serological testing for Epstein Barr Virus - developments in interpretation. *J. Inf. Dis.* 151: 984 (1985).
4. J. Luka, R.C. Chase and G. Pearson: 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 (1984).



DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy





ENZY-WELL
Epstein-Barr EBNA IgG

**For the qualitative determination of IgG
antibodies anti-Epstein Barr Nuclear Antigen
(EBNA)**

For In Vitro Diagnostic Use Only

1. INTENDED USE

Immunoenzymatic method for the qualitative determination of IgG class antibodies to **Epstein Barr Nuclear Antigen (EBNA)** in human serum.

2. INTRODUCTION

Epstein Barr Virus (EBV) is a herpesvirus which causes infectious mononucleosis (IM). It is also associated with Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma and lymphatic proliferative syndromes in immunodepressed patients. The virus is widespread throughout the world and 80-90% of the population is serum-positive.

The laboratory diagnosis of IM is traditionally performed by detecting heterophile antibodies which develop in the serum during the course of the infection, and which agglutinate horse erythrocytes. However, these antibodies may not always be present in patients affected by IM, particularly if below 14 years of age; furthermore, they may also persist for over a year after the infection. The determination of heterophile antibodies alone may therefore lead to an erroneous diagnosis. It is therefore important to determine the presence of antibodies towards the viral antigens. In particular, the detection of antibodies directed to the "Viral Capsid Antigen" (VCA) and the nuclear antigen (EBNA) is particularly useful.

During the course of IM, the IgM- and IgG-class antibodies to VCA appear early, while the IgG to EBNA develop later during the infection. The presence of IgM against VCA in the absence of IgG against EBNA therefore indicates that there is a current infection, while the presence of IgG against both VCA and EBNA is indicative of a prior infection.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). The antigen is bound to the solid phase. The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum. After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of anti-human IgG monoclonal antibodies conjugated to horseradish peroxidase. The unbound conjugate is eliminated, and the peroxidase substrate added. The blue color which develops is proportional

to the concentration of specific antibodies present in the serum sample.

When the enzymatic reaction is interrupted by the addition of a sulphuric acid solution, a yellow coloring develops. The color, proportional to the quantity of specific antibodies present in the serum, can be easily read using a microplate reader.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

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 reagents and samples.

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.
2. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay.
3. Wash hands thoroughly when finished.
4. Consult the relative Material Safety Data Sheet (available on request) for all the information on safety concerning the reagents contained in the kit.
5. Non-disposable apparatus should be sterilized after use, the preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C. All the disposable apparatus should be eliminated according to law.
6. 2 M hydrochloric acid, used for washing glassware, is corrosive and should be handled with appropriate care. In case of contact with skin or eyes, wash thoroughly with water.
7. 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%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be sufficient to ensure effective decontamination.
8. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1% 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. The OD of cut-off, controls and samples can be slightly different among different plates. For such reason if during the same run strips from different plates are used, even if the lot is the same, it is necessary to repeat the determination of the cut-off.
2. Allow all reagents to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **Working at a correct temperature is important for the incubation of the strips. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.**
3. Open the package containing the strips after 30 minutes at room temperature at least.
4. 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.
5. 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.
6. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or deionized water.
7. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
8. Do not allow wells to become dry during the test.
9. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers.
10. Care should be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the substrate and conjugate.
11. Care should be taken to avoid touching the rim of the well with conjugate.
12. Do not "blow-out" from microplates.
13. 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 to support the plates, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate Operating Manual for further details. CO2 incubators must not be used.
14. 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.
15. The use of strongly hemolyzed, lipemic, icteric samples, of serum not completely coagulated or of samples presenting microbial contamination may all constitute sources of error.
16. Care should be taken to avoid contaminating the microplate wells with disposable gloves powder.
17. The use of the kit with automated equipment has to be validated by the user.
18. For each instrument used, read the Operating Manual, in particular to obtain additional information on the following points:

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

5. KIT COMPOSITION AND REAGENT PREPARATION

Reagents are sufficient for 96 determinations.

- Bring to room temperature before use.

MT PLATE MICROPLATE 12x8 (PF 93071)

Content: 1 microplate (96 wells) coated with recombinant EBNA antigen.

Use: open the package at the opposite end from the code (E followed by the lot number) which is useful for identification purposes, remove the support and strips required. Place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

CONJ CONJUGATE 1x16 mL (PF 93509)

Content: anti-human IgG monoclonal antibodies, labeled with peroxidase, in phosphate buffer containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%. Liquid, ready for use.

CONTROL IgG - IgG NEGATIVE CONTROL 1x 1.6 mL (PF93910)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS OF THE EBV PANEL, REF 91055 VCA IgG, 91056 VCA IgM, 91057 EBNA IgG, 91058 EA IgG, 91059 EA IgM

Content: Human serum, not containing anti-EBNA IgG antibodies, diluted in phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and Sodium Azide 0.09%. Liquid, ready for use.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1x1.6 mL (PF 92073)

Content: Human serum, containing anti-EBNA IgG antibodies, diluted in phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and Sodium Azide 0.09%. Liquid, ready for use.

CONTROL CUT-OFF CUT-OFF CONTROL 1x 2 mL (PF 91873)

Content: Human serum, containing anti-EBNA IgG antibodies, diluted in phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and Sodium Azide 0.09%. Liquid, ready for use.

SAMP DIL 10 DILUENT 10 1x 100 mL (PF93621)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Content: Phosphate buffered saline (PBS) containing proteins 10% with Sodium Azide 0.09% and methyl orange as dye.

Use: To be used to dilute samples. Liquid, ready for use.

SORBENT G EBV DILUENT 1x7 mL (PF91083)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Content: Phosphate buffered saline (PBS) containing Sodium Azide 0.09% and bovine serum 10%.

Use: To be used to dilute samples (in the microwell). Liquid, ready for use.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X 1x100 mL (PF93603)
INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Content: Phosphate buffered saline (PBS), concentrated 10 times; contains Brij 0.5%.

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

SUBS TMB SUBSTRATE 1x12 mL (PF93619)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Content: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and H₂O₂ 0.01% stabilized in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8). Liquid, ready for use.

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION 1x16 mL (PF93602)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Content: H₂SO₄ 0.3 mol/L. Liquid, ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYETHYLENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Incubator at 37-40 °C
- Microplate reader (wave length 450 or 450/620 nm, with linearity up to OD ≥ 2.000)
- Microplate washer (optional) able to dispense volumes in the range 225-375 µl
- Distilled or deionized water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl of solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue

6. 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:

MICROPLATE	8 weeks at 2-8°C in polyethylene bag
CONJUGATE	8 weeks at 2-8°C
POSITIVE CONTROL	8 weeks at 2-8°C
IgG NEGATIVE CONTROL	up to the expiry date at 2-8°C
CUT-OFF CONTROL	8 weeks at 2-8°C
DILUENT 10	up to the expiry date at 2-8°C

SORBENT G	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
WASHING BUFFER	2 weeks at 2-8°C; 5 days at 15-30°C
STOP SOLUTION	up to the expiry date at 2-8°C

7. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice.

Possible consequences, in case of use of other biological liquids, are not known.

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 shaken carefully before use.

Heat-inactivation can rise to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

8. ASSAY PROCEDURE

PREPARATION

Bring all the reagents to room temperature (18-30°C) before use.

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Dilute samples 1: 26 distributing 40 µL of serum into 1 mL of diluent.

PROCEDURE

1. Distribution of the samples:
Dispense 50 µL of Sorbent G per well and 50 µL of diluted sample (duplicate testing is recommended).
Dispense 100 µL of control (positive, negative or cut-off) per well.
The minimum requisite is 1 negative control, 1 positive control and 2 cut-off controls. Leave one well for the blank (100 µL of substrate).
2. Incubation:
Incubate the plate covered with an adhesive protective film for 45 minutes at 37°C.
3. Washing:
Remove the adhesive film, aspirate the contents of all the wells and rinse 4 times, filling each well with 300 µL of washing solution. Wait 30 seconds between each wash.
4. Distribution of the conjugate:
Dispense 100 µL of conjugate in each well.
5. Conjugate Incubation:
Incubate the plate covered with an adhesive protective film for 45 minutes at 37°C.
6. Washing:
Remove the adhesive film, aspirate the contents of all the wells and rinse 4 times, filling each well with 300

µL of washing solution. Wait 30 seconds between each wash.

7. Distribution of the substrate:
Dispense 100 µL of substrate in each well.
8. Substrate incubation:
Incubate the plate for 15 minutes at room temperature.
9. Interruption of the reaction:
Dispense 100 µL of stop solution, in the same order as that followed for point 4.
10. Reading:
Read the O.D. at 450 nm or 450/620 nm within 30 minutes. Repeat the reading at 405 nm in case of O.D. > 2.000.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE FOR EBNA IgG

- STEP 1 Place 50µL of Sorbent G and 50 µL of diluted sample. Place 100 µL of all the controls (positive, negative, cut-off) in the wells of the strips. Mix well.
-
- 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 the O.D. at 450 nm or 450/620 nm within 30 min

10. TEST VALIDATION

Subtract the value of the blank (< 0.100) from all the other readings.

Negative control: the ratio between the negative control OD and cut-off OD must be $< = 0.6$.

Positive control: the positive control must have an OD at least 1.5 times higher than the cut-off.

Cut-off control: the OD of the cut-off must be ≥ 0.200 .

Repeat the test, if one of the results of the control sera is not within the acceptability range. If the problem persists contact the Scientific Support.

Tel: 0039 0577 587121
Fax: 0039 0577 587122
email: scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

Calculate the ratio between the OD value of the sample and that of the Cut-off (Index).

The sample is considered:

POSITIVE: when the Index is > 1.2

DOUBTFUL: for all the values between 0.8 and 1.2

NEGATIVE: when the Index is < 0.8

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

12. LIMITATIONS

All the values obtained require a careful interpretation that must consider other indicators relative to the patient.

The test, indeed, can not be used alone for a clinical diagnosis and the test result should be evaluated together with the patient history and other clinical diagnostic evaluation.

13. ANALITICAL SPECIFICITY

10 samples which were negative for anti-EBNA e anti-VCA IgG were tested for the determination of IgG anti-CMV, anti-Herpes Simplex and anti-Varicella. In no case did the presence of these antibodies interfere with the Enzywell EBNA IgG kit.

14. METHOD COMPARISON

In an experimentation 88 samples have been tested with Diesse kit and with a competitor kit .

Data are summarized in the following table :

		Reference		
		+	-	Total
Diesse	+	44	1	45
	-	0	43	43
	Total	44	44	88

Percent Positive Agreement (–Diagnostic Sensitivity):

100% CI_{95%}: 92.0-99.9.

Percent Negative Agreement: (–Diagnostic Specificity):

97.7% CI_{95%}: 88.1.-99.6

15. PRECISION AND REPEATABILITY

“Within run” precision between 3 different lots

Cut-off n=15	Lot 011	Lot 012	Lot 013
O.D.	0.447	0.498	0.388
CV%	5	8	6

“Between run” and “between lots” precision

Samples	INDEX			Average	CV%
	Lot 011	Lot 012	Lot 013		
EBN 1	0.27	0.26	0.18	0.24	21
EBN 2	1.10	1.17	1.24	1.17	6
EBN 3	2.11	2.46	2.21	2.26	8

16. TROUBLESHOOTING

PROBLEM	POSSIBLE ERROR	TEST OR ACTION
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).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel desiccant must be pale yellow). Repeat test.
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Collect new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that plate washer works well
Poor precision	Inadequate aspiration of wells	Ensure that plate washer works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Addition of reagents too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of air-bubbles	Avoid air-bubbles formation 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
	Inadequate volume of substrate added	Check pipette function

17. REFERENCES

- Andersson, V. Vetter et al. Avidities of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr Virus serology. *J. Med. Virology* 43: 238 (1994).
- J. Middeldorp and P. Herbrink: Epstein Barr Virus specific marker molecules for early diagnosis of

infectious mononucleosis. *J. Virol. Methods* 21: 133 (1988).

- C. Valent Sumaya: Serological testing for Epstein Barr Virus - developments in interpretation. *J. Inf. Dis.* 151: 984 (1985).
- J. Luka, R.C. Chase and G. Pearson: 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 (1984).



DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy





INSTRUCCIONES DE USO

ENZY-WELL Epstein-Barr EBNA IgG

Para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG anti-Epstein-Barr Nuclear Antigen (EBNA)

Sólo para el uso diagnóstico *in vitro*

1. INDICACIONES

Método inmunoenzimático para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG anti-Epstein-Barr Nuclear Antigen (EBNA) en suero humano.

2. INTRODUCCIÓN

El virus de Epstein-Barr (EBV) es un herpesvirus que causa la mononucleosis infecciosa (IM). Está además asociado al linfoma de Burkitt, al carcinoma nasofaringe y a síndromes linfático-proliferativos en pacientes inmunodeprimidos. El virus se difunde en todo el mundo y el 80/90% de la población resulta seropositiva.

La diagnóstico de laboratorio de IM se hace tradicionalmente por medio de revelación de la presencia en suero de anticuerpos eterófilos aglutinantes de eritrocitos de caballo, que se desarrollan durante el curso de la enfermedad. Sin embargo esos anticuerpos pueden no estar presentes en sujetos con IM, especialmente con menos de 14 años de edad y además pueden seguir para más de un año después de la infección. La sólo búsqueda de anticuerpos eterófilos puede por eso conducir a una diagnóstico errónea,

Por eso es importante la búsqueda de anticuerpos dirigidos hacia antígenos virales. En particular, se revela útil la búsqueda de anticuerpos dirigidos hacia el complejo antigénico llamado "Viral Capsid Antigen" (VCA) y el antígeno nuclear (EBNA).

Durante el curso de IM los anticuerpos IgM e IgG anti-VCA aparecen muy precozmente, mientras los anticuerpos IgG anti-EBNA se desarrollan más tarde. Por eso la presencia de IgM anti-VCA en ausencia de IgG anti-EBNA indica infección en curso, mientras la presencia de IgG anti-VCA e anti-EBNA dirige hacia una diagnóstico de infección anterior.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). El antígeno está unido 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 hayan reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos monoclonales humanos anti-IgG conjugados con peroxidasa de rábano.

El conjugado que no se haya unido se elimina y se añade el sustrato peroxidasa. El color azul que se desarrolla es

proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.

Cuando la reacción enzimática se interrumpe después de la adición de una solución de ácido sulfúrico, el color se vuelve amarillo. El color, proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en el suero, se puede observar en un lector para microplacas.

4. PRECAUCIONES

PARA USO EXCLUSIVO EN DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

Este kit contiene materiales de origen humano que han sido testados y han dado resultados negativos en métodos aprobados 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 garantía completa 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 normas 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, de acuerdo con las disposiciones normativas vigentes.

Advertencias para la seguridad personal

1. No pipetear por vía oral.
2. Usar guantes desechables y protección para los ojos al manipular las muestras y durante la prueba.
3. Lavarse bien las manos después de terminar el test.
4. Sobre las características de seguridad de los reactivos contenidos en el kit, consultar la Ficha de Seguridad (disponible bajo solicitud).
5. Los aparatos no desechables se deben esterilizar después su uso. El método preferido es autoclavar durante 1 h a 121°C; todos los aparatos desechables se deben eliminar según las normas vigentes.
6. El ácido clorhídrico 2M usado para limpiar la cristalería es corrosivo; utilizar estos materiales con cuidado. En caso de contacto con la piel u ojos, limpiar con mucha agua.
7. Los ácidos neutralizados y los demás residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
8. 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%, antes de se que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que se limpie la zona.

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. La D.O. del Cut-Off, de los controles y de las muestras puede ser ligeramente diferente entre placas diferentes. Por tanto, si se utilizan en la misma sesión de tiras de placas diferentes, aunque sean del mismo lote, es necesario repetir la determinación del Cut-Off.
2. Poner todos los reactivos 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 disponer de una regulación de termostato correcta para la incubación de las tiras. Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C o por encima de 39°C..**
3. Abrir el sobre que contiene las tiras al menos media hora después a temperatura ambiente.
4. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada, ya que puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
5. 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.
6. Lavar con ácido hidroclicórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
7. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
8. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
9. Evitar el uso de congeladores autodescongelantes para la conservación de las muestras.
10. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para el uso con el sustrato y con el conjugado.
11. Evitar tocar el borde del pocillo con el conjugado.
12. No salpicar sobre las microplacas.
13. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un efecto particular 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. Como alternativa, se puede incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO₂.
14. 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.
15. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, lipémicas, ictéricas, de suero

no coagulado completamente o de muestras que presentan contaminación microbiana.

16. Evitar la contaminación de los pocillos con el polvo de guantes desechables.
17. El uso del kit con equipos automáticos debe ser aprobado por el usuario.
18. Leer el manual de usuario de cada equipo y, especialmente, 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.

5. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Reactivos suficientes para 96 determinaciones.

Poner los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 (PF 93071)

Contenido: 1 placa de 96 pocillos sensibilizados con antígeno EBNA recombinante

Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (E 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 con fuerza.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL (PF 93509)

Contenido: anticuerpos monoclonales anti-IgG humanos marcados con peroxidasa, en tampón fosfato con fenol 0.05% y Bronidox 0.02%. Líquido, listo para su uso.

CONTROL IgG - IgG CONTROL NEGATIVO 1x 1.6 mL (PF93910)

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, libre de anticuerpos anti-EBNA IgG, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y Azida Sódica al 0.09%. Líquido, listo para su uso.

CONTROL + CONTROL POSITIVO 1x1.6 mL (PF 92073)

Contenido: Suero humano con anticuerpos anti-EBNA IgG, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y Azida Sódica al 0.09%. Líquido, listo para su uso.

CONTROL CUT-OFF CONTROL CUT-OFF 1x 2 mL (PF 91873)

Contenido: Suero humano con anticuerpos anti-EBNA IgG, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y Azida Sódica al 0.09%. Líquido, listo para su uso.

SAMP DIL 10 DILUYENTE 10 1x100 mL (PF93621)

INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES

Contenido: Solución salina tamponada (PBS) que contiene proteínas 10%, con Azida Sódica 0.09% con adición de metilnaranja como colorante.

Uso: Para la dilución de las muestras. Líquido, listo para su uso.

SORBENT G DILUYENTE EBV 1x7 mL (PF91083)

INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES

Contenido: Solución salina tamponada (PBS) con Azida Sódica 0.09% y suero bovino 10%.

Uso: Poner dentro de los pocillos para diluir las muestras. Líquido, listo para su uso.

WASH BUF 10x TAMPÓN DE LAVADO 10X 1x100 mL (PF93603)

INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES

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

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

SUBS TMB SUSTRATO 1x 12 mL (PF93619)

INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H₂O₂ 0.01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3.8). Líquido, listo para su uso.

H₂SO₄ 0,3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE 1x16 mL (PF93602)

INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES

Contenido: Solución de H₂SO₄ 0.3 mol/L.

Líquido, listo para su uso.

CINTA ADHESIVA (2)

BOLSA DE PLÁSTICO (1)

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- Incubador a 37-40°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 absorbente

6. 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.

MICROPLACA	8 semanas 2-8°C - bolsa de plástico
CONJUGADO	8 semanas 2-8°C
CONTROL POSITIVO	8 semanas 2-8°C
CONTROL NEGATIVO	hasta la fecha de caducidad a 2-8°C
CONTROL CUT-OFF	8 semanas 2-8°C
DILUYENTE 10	hasta la fecha de caducidad a 2-8°C
SORBENT G	5 semanas 2-8°C
SUSTRATO	hasta la fecha de caducidad a 2-8°C, 1 semana a 15-30°C en ambiente oscuro
TAMPÓN DE LAVADO	2 semanas 2-8°C; 5 días 15-30°C
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la fecha de caducidad a 2-8°C

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

La muestra consta de suero extraído de la vena de forma común y debe manipularse siguiendo las precauciones dictadas por la buena práctica de laboratorio.

No se conocen las consecuencias del uso de otros líquidos biológicos.

El suero fresco se puede conservar a 2/8°C durante 4 días; para conservaciones más largas congelar a -20°C.

La muestra se puede descongelar hasta un máximo de 3 veces.

No deben ser utilizados congeladores autodescongelantes para la conservación de la muestra. Después de descongelar, agitar con cuidado antes de su uso.

La inactivación por calor puede conducir a resultados erróneos. La calidad de la muestra puede verse seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.

8. PROCEDIMIENTO PREPARACIÓN

Antes de empezar la prueba, llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (18-30°C).

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Diluir las muestras 1: 26 poniendo 40 µL de suero en 1 mL de diluyente.

REALIZACIÓN DE LA PRUEBA

1. **Distribución de las muestras:**
Distribuir 50 µl de Sorbent G por pocillo y 50 µl de muestra diluida (es preferible realizar el análisis por duplicado).
Distribuir 100 µl de control (positivo, negativo o cut-off) por pocillo.
El requisito mínimo indispensable es de 1 control negativo, 1 control positivo y 2 controles Cut-Off. Dejar un pocillo de la tira para el blanco (100 µL de sustrato).
2. **Incubación:**
Incubar la placa cubierta con hoja adhesiva a 37°C durante 45 minutos.
3. **Lavado:**
Retirar la hoja adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar 4 veces llenando cada pozo con 300 µL de solución de lavado. Esperar 30 segundos antes de cada lavado.
4. **Distribución del conjugado:**
Distribuir 100 µL de conjugado para cada pocillo de la placa.
5. **Incubación del conjugado:**
Incubar la placa cubierta con hoja adhesiva a 37°C durante 45 minutos.
6. **Lavado:**
Retirar la hoja adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar 4 veces llenando cada pozo con 300 µL de solución de lavado. Esperar 30 segundos antes de cada lavado.
7. **Distribución del sustrato:**
Distribuir 100 µL de sustrato para cada pocillo de la placa.
8. **Incubación del sustrato:**
Incubar la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos.
9. **Parada de la reacción:**
Distribuir 100 µL de solución de bloqueo siguiendo el mismo orden de añadido que en el punto 4.
10. **Lectura:**
Leer las D.O. a 450 nm o 450/620 nm en 30 min. como máximo. Volver a leer a 405 nm si hay D.O. superiores a 2.000.

9. ESQUEMA DEL ENSAYO PARA EBNA IgG

- | | |
|--------|---|
| PASO 1 | Poner 50 µL de Sorbent G y 50 µL de suero diluido. Echar 100 µL de todos los controles (positivo, negativo y cut-off) en los pocillos de la tira. Agitar. |
| | - |
| | Incubar 45 min. a 37°C |
| | - |
| | Lavar 4 veces (300 µL) |
| | - |
| PASO 2 | Poner 100 µL de conjugado en cada pocillo |
| | - |
| | Incubar 45 min. a 37°C |
| | - |

Lavar 4 veces (300 µL)

- | | |
|--------|---|
| PASO 3 | Poner 100 µL de Sustrato en cada pocillo |
| | - |
| | Incubar 15 min. a t.a. |
| | - |
| PASO 4 | Añadir 100 µL de Solución Bloqueante |
| | - |
| | Leer la D.O a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min. |

10. VALIDACIÓN DEL TESTRestar el valor del blanco (≤ 0.100) a todas las otras lecturas.Control negativo: La relación entre la D.O. del control negativo y la D.O. del cut-off debe ser ≤ 0.6 .Control positivo: el control positivo debe tener una D.O. de al menos 1,5 veces la del suero cut-off.Control cut-off: la D.O. del cut-off debe ser ≥ 0.200 .

Si uno de los resultados de los sueros de control no entra en el intervalo de aceptabilidad, repetir la prueba. Si el problema persiste, contactar con el Scientific Support.

Tel: 0039 0577 587121
 Fax: 0039 0577 587122
 e-mail: scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

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

La muestra se considera:

POSITIVA: cuando el Index es > 1.2 DUDOSA: para todos los valores $0.8 - 1.2$ NEGATIVA: cuando el Index es < 0.8

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

12. LIMITACIONES

Todos los valores obtenidos precisan una atenta interpretación que no prescinda de otros indicadores relativos al mismo paciente.

Este test, de hecho, no debe ser la única prueba utilizada para el diagnóstico clínico. El resultado de la prueba se debe evaluar junto con los datos clínicos y otros procedimientos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

10 muestras de pacientes negativos a los anticuerpos IgG anti-EBNA se probaron para la determinación de las IgG anti-CMV, anti-Herpes Simplex y anti-Varicella. En ningún caso la presencia de dichos anticuerpos interfería con el kit Enzywell EBNA IgG.

14. ESTUDIOS DE COMPARACIÓN

En una prueba, se analizaron 88 muestras con el kit Diesse y con otro kit comercial.

A continuación se muestran los datos de la prueba:

		Referencia		
		+	-	Total
Diesse	+	44	1	45
	-	0	43	43
	Total	44	44	88

Percent Positive Agreement (~Sensibilidad de Diagnóstico):

100% CI_{95%}: 92.0-99.9

Percent Negative Agreement: (~Especificidad de Diagnóstico):

97.7% CI_{95%}: 88.1.-99.6

15. PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD

Precisión intra-ensayo ejecutada sobre 3 lotes distintos

Cut-off n=15	Lotto 011	Lotto 012	Lotto 013
D.O.	0.447	0.498	0.388
CV%	5	8	6

Precisión en series y lotes

Muestra	INDEX				CV%
	Lote 011	Lote 012	Lote 013	Media	
EBN 1	0.27	0.26	0.18	0.24	21
EBN 2	1.10	1.17	1.24	1.17	6
EBN 3	2.11	2.46	2.21	2.26	8

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSIBLES FUENTES DE ERROR	ACCIONES A REALIZAR
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 no se ha añadido algún reactivo Repetir la prueba.
	Placa no reactiva	Controlar el código del envase de la placa (ver información técnica).

		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.
	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.
Desarrollo escaso del color	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.
	Tiempo o temperatura de incubación incorrectos	Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.
	Volumen inadecuado de sustrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. BIBLIOGRAFÍA

- Andersson, V. Vetter et al. Avidities of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr Virus serology. J. Med. Virology 43: 238 (1994).
- J. Middeldorp and P. Herbrink: Epstein Barr Virus specific marker molecules for early diagnosis of infectious mononucleosis. J. Virol. Methods 21: 133 (1988).
- C. Valent Sumaya: Serological testing for Epstein Barr Virus - developments in interpretation. J. Inf. Dis. 151: 984 (1985).
- J. Luka, R.C. Chase and G. Pearson: 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
(1984).



DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy





INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ENZY-WELL Epstein-Barr EBNA IgG

Para a determinação qualitativa dos anticorpos IgG anti-Epstein-Barr Nuclear Antigen (EBNA)

Somente para uso diagnóstico in vitro

1. UTILIZAÇÃO

Método imunoenzimático para a determinação qualitativa dos anticorpos IgG anti-Epstein-Barr Nuclear Antigen (EBNA) no soro humano.

2. INTRODUÇÃO

El virus de Epstein-Barr (EBV) es un herpesvirus que causa la mononucleosis infecciosa (IM). Está además asociado al linfoma de Burkitt, al carcinoma nasofaringe y a síndromes linfático-proliferativas en pacientes inmunodprimidos. El virus se difunde en todo el mundo y el 80/90% de la población resulta sueropositiva.

La diagnóstico de laboratorio de IM se hace tradicionalmente por medio de revelación de la presencia en suero de anticuerpos eterófilos aglutinantes de eritrocitos de caballo, que se desarrollan durante el curso de la enfermedad. Sin embargo esos anticuerpos pueden no estar presentes en sujetos con IM, especialmente con menos de 14 años de edad y además pueden seguir para más de un año después de la infección. La sólo búsqueda de anticuerpos eterófilos puede por eso conducir a una diagnóstico errónea,

Por eso es importante la búsqueda de anticuerpos dirigidos hacia antígenos virales. En particular, se revela útil la búsqueda de anticuerpos dirigidos hacia el complejo antigénico llamado "Viral Capsid Antigen" (VCA) y el antígeno nuclear (EBNA).

Durante el curso de IM los anticuerpos IgM e IgG anti-VCA aparecen muy precozmente, mientras los anticuerpos IgG anti-EBNA se desarrollan más tarde. Por eso la presencia de IgM anti-VCA en ausencia de IgG anti-EBNA indica infección en curso, mientras la presencia de IgG anti-VCA e anti-EBNA dirige hacia una diagnóstico de infección anterior.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O teste é baseado na técnica ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática). O antígeno liga-se à fase sólida. As imunoglobulinas específicas são ligadas ao antígeno após a incubação com soro humano diluído. Após as lavagens para eliminar as proteínas que não reagiram, a incubação é efetuada com conjugado composto por anticorpos monoclonais anti-IgG humanos conjugados com peroxidase de rábano. O conjugado não aderido é eliminado e o substrato de peroxidase é adicionado. A cor azul que se forma é proporcional à

concentração de anticorpos específicos presentes no soro analisado.

Quando a reação enzimática é interrompida com a adição de uma solução de ácido sulfúrico, o soro fica amarelo. A cor, proporcional à quantidade de anticorpos específicos presentes no soro, pode ser lida num leitor para microplacas.

4. PRECAUÇÕES

SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

Este kit contém materiais de origem humana com os quais foram testados de acordo com os testes aprovados pela FDA e os resultados foram negativos para a presença de HBsAg, anticorpos anti-HIV-1, anti HIV-2 e anti-HCV. Visto que nenhum teste de diagnóstico pode oferecer uma garantia completa em relação à ausência de agentes infecciosos, todos os materiais de origem humana precisam ser considerados potencialmente infectados. Todos os reagentes e as amostras devem ser manuseados conforme as regras de segurança definidas em cada laboratório.

Eliminação de resíduos: as amostras de soro e os reagentes utilizados devem ser tratados como resíduos infectados e, portanto, devem ser eliminados de acordo com as disposições de lei em vigor.

Advertências para a segurança individual

1. Não pipetar com a boca.
2. Usar luvas descartáveis e uma proteção para os olhos quando manusear as amostras e executar o ensaio.
3. Lavar muito bem as mãos ao terminar o teste.
4. Em mérito às características de segurança dos reagentes contidos no kit, consultar a Ficha de Segurança (Disponível a pedido).
5. Aparelhos não descartáveis devem ser esterilizados após a utilização. O método preferido é a autoclave por 1 hora a 121°C; todos os aparelhos descartáveis devem ser eliminados de acordo com as normas vigentes.
6. O ácido hidrolórico 2M usado na lavagem de recipientes de vidros são corrosivos e devem ser manuseados com cuidado. Em caso de contato com a pele ou com os olhos, lavar a área abundantemente com água.
7. Os ácidos neutralizados e os outros resíduos líquidos devem ser desinfetados adicionando um volume de hipoclorito de sódio suficiente para obter uma concentração final pelo menos de 1%. A exposição ao hipoclorito de sódio a 1% durante 30 minutos deverá ser suficiente para garantir uma desinfecção eficaz.
8. Eventuais derramamentos de materiais potencialmente infectados devem ser absorvidos imediatamente com papel absorvente e a área afectada deverá ser descontaminada, por exemplo com hipoclorito de sódio a 1%, antes de continuar o trabalho. Se estiver presente um ácido, o hipoclorito de sódio não pode ser usado antes de enxugar a área.

Todos os materiais usados para descontaminar eventuais derramamentos acidentais, incluindo as luvas, devem ser eliminados como lixo potencialmente infeccioso.

Não esterilizar na autoclave materiais contendo hipoclorito de sódio.

Advertências analíticas

1. A D.O. do Cut-Off, dos controlos e das amostras pode ser ligeiramente diferente entre diversas placas. Então, caso seja utilizado no mesmo ensaio as tiras de placas diversas, até do mesmo lote, é necessário repetir a determinação do Cut-Off.
2. Antes da utilização, deixar que todos os reagentes alcancem a temperatura ambiente (18-30°C). Recolocar imediatamente os reagentes à temperatura recomendada para armazenamento após a utilização.
É importante trabalhar à temperatura correta para a incubação das tiras. Certificar-se de que o termóstato não fique abaixo de 35°C nem acima de 39°C.
3. Abrir o saco que contém as tiras pelo menos após 30 minutos que estiver em temperatura ambiente.
4. Não utilizar os reagentes além do prazo de validade. A contaminação microbiológica de reagentes deve ser evitada, visto que poderá reduzir a duração do produto e provocar resultados errados.
5. Não modificar o procedimento e não substituir os reagentes por outros de outros fabricantes ou outros lotes de reagente, a não ser que sejam classificados como intermutáveis. Não reduzir o tempo de incubação recomendado.
6. Qualquer recipiente de vidro a ser usado no teste deve ser devidamente lavado com ácido hidrocloreto 2M e depois enxaguado com água destilada ou água deionizada.
7. Não expor reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.
8. Não deixar que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.
9. Evitar a utilização de congeladores no frost para a conservação de amostras.
10. Evitar a contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com o substrato e o conjugado.
11. Evitar tocar a borda do poço com o conjugado.
12. Não "soprar" nas microplacas.
13. Os ensaios de imunoenzimas podem exibir ocasionalmente um "efeito de margem". É possível minimizar tal efeito aumentando a humidade durante as fases de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas a 37°C, em banho-maria usando uma sustentação para as placas, ou num incubador. Alternativamente, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Para maiores informações, consultar o manual específico operacional do instrumento. Os incubadores de CO₂ não devem ser utilizados.

14. Antes de ler a placa, certificar-se de que a parte inferior da placa está limpa e seca e que não existem bolhas na superfície do líquido.
15. A utilização de amostras altamente hemolisadas, lipémicas, ictericas, soros coagulados de forma incompleta ou amostras com contaminação bacteriana podem gerar resultados errados.
16. Evitar a contaminação dos poços com o talco das luvas descartáveis.
17. O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado pelo utilizador.
18. Para cada instrumento utilizado, leia atentamente o Manual de Utilização do para obter informações adicionais sobre os seguintes pontos:
 - instalação e requisitos especiais
 - princípios de funcionamento, instruções, precauções e riscos
 - especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
 - manutenção e assistência técnica

5. COMPOSIÇÃO DO KIT E PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Os reagentes são suficientes para 96 determinações.

Deixar os reagentes em temperatura ambiente antes da utilização.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 (PF 93071)

Conteúdo: 1 placa de 96 poços sensibilizados com antígeno EBNA recombinante.

Utilização: Abrir a embalagem da placa a partir do lado oposto ao código (E seguido do número do lote), que é útil para fins de identificação, retirar o suporte e as tiras necessárias. Recolocar as outras não utilizadas no saco de polietileno com o gel de sílica esvaziar o ar e fechar o pacote premindo o fecho.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL (PF 93509)

Conteúdo: anticorpos monoclonais anti-IgG humanas marcados com peroxidase, numa solução tampão de fosfato contendo fenol 0.05% e Bronidox 0.02%. Líquido, pronto a usar.

CONTROL IgG - IgG CONTROLO NEGATIVO 1x 1.6 mL (PF93910)

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, sem anticorpos anti-EBNA IgG, diluído em tampão de fosfato 0.01 mol/L contendo BSA 1% e Azida de Sódio 0.09%. Líquido, pronto a usar.

CONTROL + CONTROLO POSITIVO 1x1.6 mL (PF 92073)

Conteúdo: Soro humano que contém anticorpos IgG anti-EBNA, diluído em tampão de fosfato 0.01 mol/L contendo BSA 1% e Azida de Sódio 0.09%. Líquido, pronto a usar.

CONTROL CUT-OFF CONTROLO CUT-OFF 1x 2 mL (PF 91873)

Conteúdo: Soro humano que contém anticorpos IgG anti-EBNA, diluído em tampão de fosfato 0.01 mol/L contendo BSA 1% e Azida de Sódio 0.09%. Líquido, pronto a usar.

SAMP DIL 10 DILUENTE 10 1x100 mL (PF93621)

INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES

Conteúdo: Solução salina tamponada (PBS) que contém proteínas 10%, com Azida de Sódio a 0.09% e metil-orange como corante.

Utilização: Para diluição das amostras. Líquido, pronto a usar.

SORBENT G DILUENTE EBV 1x7 mL (PF91083)

INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES

Conteúdo: Solução salina tamponada (PBS) com Azida de Sódio 0.09% e soro bovino 10%.

Utilização: Usar para a diluição das amostras (no poço). Líquido, pronto a usar.

WASH BUF 10X TAMPÃO DE LAVAGEM 10X 1x100 mL (PF93603)

INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES

Conteúdo: Solução salina tamponada (PBS), concentrada 10 vezes, que contém Brij 0.5%.

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

SUBS TMB SUBSTRATO 1x12 mL (PF93619)

INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES

Conteúdo: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL e H₂O₂ 0.01% estabilizados num tampão de citrato 0.05 mol/L (pH 3.8). Líquido, pronto a usar.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM 1x16 mL (PF93602)

INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES

Conteúdo: Solução de H₂SO₄ 0.3 mol/L. Líquido, pronto para o uso.

Líquido, pronto a usar.

PELÍCULAS ADESIVAS (2).

SACO DE POLIETILENO (1).

OUTROS MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS QUE NÃO FORAM FORNECIDOS.

- Incubador a 37-40 °C
- Leitor de microplacas (comprimento de onda 450 ou 450/620 nm, com linearidade até OD >= 2,000)
- Sistema de lavagem de microplacas (preferível) capaz de fornecer volumes entre 225-375 µl
- Água destilada ou deionizada
- Recipientes de vidro normais para laboratório: cilindros, provetas, etc.

- Micropipetas capazes de recolher com precisão 10, 100, 1000 µl de solução
- Luvas descartáveis
- Temporizador
- Solução de hipoclorito de sódio 5%
- Recipientes para recolha de materiais potencialmente infectados
- Papel absorvente

6. MODALIDADES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes devem ser conservados a 2-8°C.

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

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

MICROPLACA	8 semanas a 2-8°C em saco de polietileno
CONJUGADO	8 semanas a 2-8°C
CONTROLO POSITIVO	8 semanas a 2-8°C
IgG CONTROLO NEGATIVO	até ao prazo de validade a 2-8°C
CONTROLO CUT-OFF	8 semanas a 2-8°C
DILUENTE 10	até ao prazo de validade a 2-8°C
SORBENT G	5 semanas a 2-8°C
SUBSTRATO	até ao prazo de validade a 2-8°C; 1 semana a 15-30°C; guardar ao abrigo da luz
TAMPÃO DE LAVAGEM	2 semanas a 2-8°C, 5 dias a 15-30°C
SOLUÇÃO DE PARAGEM	até ao prazo de validade a 2-8°C

7. TIPO DE AMOSTRAS E CONSERVAÇÃO

O tipo de amostra é representado por soro, obtido de sangue recolhido das veias e manuseado de acordo com os procedimentos standard de laboratório.

Não são conhecidas as consequências provocadas pelo uso de outros líquidos biológicos.

O soro fresco pode ser conservado durante 4 dias entre 2 e 8°C; para períodos de conservação mais prolongados, congelar a -20°C.

A amostra pode ser descongelada até um máximo de 3 vezes. Evitar o uso de congeladores no frost para a conservação das amostras. Depois de descongelar, misturar cuidadosamente antes do teste.

A inativação de calor pode levar a resultados errados. A qualidade das amostras pode ser gravemente influenciada pela contaminação bacteriana, que pode gerar resultados errados.

8. PROCEDIMENTO

PREPARAÇÃO

Antes de iniciar o teste, deixar que todos os reagentes alcancem a temperatura ambiente (18-30°C).

- Preparar a quantidade necessária de tiras

- Preparar o tampão de lavagem diluindo-o tampão de lavagem 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Diluir as amostras 1: 26 distribuindo 40 µL de soro em 1 mL de diluente.

EXECUÇÃO DO TESTE

1. Distribuição das amostras:
Distribuir 50 µL de Sorbent G por poço e 50 µL de amostra diluída (é preferível efetuar uma análise dupla).
Distribuir 100 µL de controlo (positivo, negativo ou de cut-off) por poço.
O requisito mínimo indispensável é 1 controlo negativo, 1 controlo positivo e 2 controlos de cut-off. Deixar um poço da tira para o branco (100 µL de substrato).
2. Incubação:
Incubar a placa coberta com folha adesiva a 37°C por 45 minutos.
3. Lavagem:
Remover a folha adesiva, aspirar o conteúdo de todos os poços e lavar 4 vezes, enchendo cada poço com 300 µL de solução de lavagem. Aguardar 30 segundos antes de cada lavagem.
4. Distribuição do conjugado:
Distribuir 100 µL de conjugado para cada poço da placa.
5. Incubação do conjugado:
Incubar a placa coberta com folha adesiva a 37°C por 45 minutos.
6. Lavagem:
Remover a folha adesiva, aspirar o conteúdo de todos os poços e lavar 4 vezes, enchendo cada poço com 300 µL de solução de lavagem. Aguardar 30 segundos antes de cada lavagem.
7. Distribuição do substrato:
Distribuir 100 µL de substrato para cada poço da placa.
8. Incubação do substrato:
Incubar a placa em temperatura ambiente por 15 minutos.
9. Parada da reação:
Distribuir 100 µL de solução de paragem seguindo a mesma ordem de adição do ponto 4.
10. Leitura:
Ler as D.O. a 450 nm ou 450/620 nm no prazo de 30 min. Efetuar novamente a leitura a 405 nm em caso de D.O. superiores a 2.000.

9. ESQUEMA DO ENSAIO PARA EBNA IgG

- PASSO 1 Distribuir 50 µL de Sorbent G e 50 µL de soro diluído. Distribuir 100 µL de todos os controlos (positivo, negativo e de cut-off) nos poços da tira. Agitar.
-
- Incubar durante 45 minutos a 37°C
-
- Lavar 4 vezes (300 µL)
-
- PASSO 2 Distribuir 100 µL de conjugado em cada poço
-
- Incubar durante 45 minutos a 37°C

-
Lavar 4 vezes (300 µL)

- PASSO 3 Distribuir 100 µL de substrato em cada poço
-
- Incubar durante 15 minutos em temperatura ambiente.
-
- PASSO 4 Adicionar 100 µL de Solução de Paragem.
-
- Ler a D.O. a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min.

10. VALIDAÇÃO DO TESTE

Tirar o valor do branco (<= 0.100) de todas as outras leituras.

Controlo negativo: A relação entre a D.O. do controlo negativo e a D.O. do cut-off deve ser < = 0.6.

Controlo positivo: o controlo positivo deve ter uma D.O. de pelo menos 1.5 vez aquela do soro de cut-off

Controlo cut-off: a D.O. do cut-off >= 0.200.

Se um dos resultados dos soros de controlo estiver fora do intervalo de aceitação, repetir o teste. Se o problema persistir, contatar o Scientific Support.

Tel: 0039 0577 587121
Fax: 0039 0577 587122
email: scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Calcular a relação entre o valor DO da amostra e aquela do cut-off (INDICE).

A amostra é considerada:

POSITIVA: quando o Índice for > 1.2

INCERTA: per tutti i valori 0.8 – 1.2

NEGATIVA: quando l'Index è < < 0.8

Repetir o teste em caso de resultado incerto. Se o resultado continua incerto, repetir a colheita.

12. LIMITAÇÕES

Todos os valores obtidos necessitam de uma interpretação atenta independentemente dos outros indicadores relativos ao mesmo paciente.

O teste, de fato, por si só não pode ser utilizado para um diagnóstico clínico definitivo.

O resultado do teste deve ser sempre avaliado em conjunto com os dados provenientes da anamnese do paciente e/ou com outros procedimentos diagnósticos.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas 10 amostras que estavam negativas para IgG anti-EBNA e anti-VCA IgG para a determinação de IgG anti-CMV, anti-Herpes Simplex e anti-Varicela. Em nenhum caso a presença destes anticorpos interfere com o Kit EBNA IgG.

14. ESTUDOS DE COMPARAÇÃO

Numa experimentação foram analisadas 88 amostras com o kit Diesse e com um outro kit do mercado.

Esquematzam-se, de seguida, os dados da experimentação:

		Referência		
		+	-	Total
Diesse	+	44	1	45
	-	0	43	43
	Total	44	44	88

Percent Positive Agreement (~Sensibilidade Diagnóstica):

100% CI_{95%}: 92.0-99.9.

Percent Negative Agreement (~Especificidade Diagnóstica):

97.7% CI_{95%}: 88.1.-99.6

15. PRECISÃO E REPETIBILIDADE

Precisão intra-ensaios efectuada entre 3 lotes diferentes

Valor n=15	directo	Lote 011	Lote 012	Lote 013
D.O.		0.447	0.498	0.388
CV%		5	8	6

Precisão entre testes e entre lotes

Amostras	ÍNDICE DIRECTO				
	Lote 011	Lote 012	Lote 013	Média	CV%
EBN 1	0.27	0.26	0.18	0.24	21
EBN 2	1.10	1.17	1.24	1.17	6
EBN 3	2.11	2.46	2.21	2.26	8

16. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSÍVEIS FONTES DE ERRO	AÇÕES A SEREM ADOTADAS
Ensaio inválido (todos negativos)	Um ou mais reagentes não foram adicionados ou estão na sequência incorreta	Verificar o procedimento. Verificar se algum reagente não foi utilizado. Repetir o teste
	Placa não reativa	Verificar o código no saco da placa (ver as instruções de uso).

		Verificar a existência de humidade na placa não utilizada. (O gel de sílica deve estar amarelo). Repetir o teste
Ensaio inválido (todos positivos)	Contaminação do substrato	Recolher nova quota de substrato.
	Lavagem inadequada	Certificar-se de que o aparelho de lavagem esteja funcionando direito
Pouca precisão	Aspiração inadequada de poços	Certificar-se de que o aparelho de lavagem esteja funcionando direito
	Erro de pipetagem	Verificar o funcionamento da pipeta
	A adição de reagente é muito lenta	Evitar a secagem da placa após a lavagem. Adicionar os reagentes imediatamente
	Presença de bolhas	Evitar a formação de bolhas de ar durante a pipetagem.
	A passagem óptica não está limpa	Verificar se existe sujidade na fonte de luz do instrumento e do detector. Limpar o fundo da placa com um lenço de papel.
Desenvolvimento inadequado de cor	Tempos ou temperatura de incubação inadequados	Verificar o monitoramento da temperatura e o tempo de incubação
	Volume inadequado do substrato adicionado à placa	Verificar a função de pipetagem

17. BIBLIOGRAFIA











1. A. Andersson, V. Vetter et al. Avidities of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr Virus serology. J. Med. Virology 43: 238 (1994).
2. J. Middeldorp and P. Herbrink: Epstein Barr Virus specific marker molecules for early diagnosis of infectious mononucleosis. J. Virol. Methods 21: 133 (1988).
3. C. Valent Sumaya: Serological testing for Epstein Barr Virus - developments in interpretation. J. Inf. Dis. 151: 984 (1985).
4. J. Luka, R.C. Chase and G. Pearson: 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 (1984).



DIESE Diagnostica Senese S.p.A.
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy



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