



ENZYWELL

EPSTEIN BARR VCA IgM

REF 91056 (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 DEL TEST / PROCEDIMENTO DE TESTE
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



ISTRUZIONI PER L'USO

**ENZYWELL
EPSTEIN BARR VCA IgM**

REF 91056

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA DEGLI ANTICORPI IgM VERSO L'ANTIGENE DEL CAPSIDE VIRALE DEL VIRUS EPSTEIN-BARR NEL SIERO UMANO. DA UTILIZZARE COME AUSILIO ALLA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA EPSTEIN BARR VIRUS.

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 da EBV parzialmente purificato viene legato alla fase solida. Per incubazione con siero umano diluito le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene. Il Sorbent M evita l'interferenza del fattore reumatoide. Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti IgM 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 a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE MICROPIASTRA 12 x 8 pozzetti sensibilizzati con antigeni dell'Epstein-Barr Virus.

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta al codice (VM, seguito dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto e gli strips 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.

CAL CALIBRATORI 3 x 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. Il titolo in unità arbitrarie, riportato in etichetta, è 20-80-160 AU/ml. Il calibratore 1 con 20 UA/ml corrisponde al cut-off.

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 M IgG UMANE DENATURATE 1 x 7 mL

Da porre nei pozzetti dei campioni per neutralizzare le reazioni aspecifiche (fattore reumatoide).

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) contenente IgG umane denaturate e sodio azide 0,09%. Pronto all'uso.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Pronto all'uso **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H₂O₂ 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H₂SO₄ 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:

REAGENTE	CONDIZIONI
MICROPIASTRA	5 settimane 2/8°C busta di polietilene
CONTROLLO /CALIBRATORI	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 M	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 CO₂.
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, 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

- 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. Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato. Distribuire 50 µL di Sorbent M e 50 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato). In uno strip porre il Controllo Negativo (NON DILUITO) e i calibratori (NON DILUITI) (100 µL per pozzetto senza il Sorbent M), preferibilmente in doppio.

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.

9. SCHEMA DEL SAGGIO

Lasciare un pozzetto libero per il bianco.

- | | |
|--------|--|
| STEP 1 | Distribuire 50 µL di Sorbent M, 50 µL di siero diluito e 100 µL del Controllo Negativo e dei calibratori 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 (<0.150) a tutte le altre letture. Il controllo positivo (CALIBRATORE 3) deve avere O.D. >= 1.0. Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere <=0.6. La D.O. del Cut-off deve essere >= 0.2 a 450 nm e >= 0.16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Risultati qualitativi

Se il valore dell'assorbanza del campione è superiore al Cut-off (CALIBRATORE 1) il campione risulta positivo per la presenza di IgM specifiche per l'antigene.

Calcolare il rapporto (INDEX) fra il valore della O.D. del campione in esame e quello del Cut-off (CALIBRATORE 1). Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è > 1.2 .

Dubbio: $= \pm 20\%$ 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 semiquantitativi

Unità Arbitrarie (AU)

I risultati possono essere espressi in unità arbitrarie riportando la OD del campione su una curva costruita con i 3 calibratori più il controllo negativo che ha 0 AU/ml.

- *IMMUNE*: quando la concentrazione di IgM VCA nel campione è > 24 UA/mL
- *NON IMMUNE*: quando la concentrazione di IgM anti-VCA è < 16 UA/mL.
- *DUBBIO*: quando il valore è compreso fra 16 e 24. In tal caso è consigliabile ripetere la determinazione in duplicato. Se il valore rimane dubbio ripetere il prelievo dopo 2 settimane circa.

12. LIMITAZIONI DEL TEST

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

Le caratteristiche delle performances 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.

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

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 14 campioni di soggetti in fase acuta affetti da Citomegalovirus o Herpes Simplex o Varicella Zoster ed inoltre, 5 campioni contenenti anticorpi anti-DNA. Inoltre è stata studiata l'interferenza di campioni fortemente emolizzati (n=3, 6 g/dL) o contenenti trigliceridi (n=7, fino a 1368 mg/dl), bilirubina (n=6, fino a 11 mg/dL), Fattore Reumatoide (n=9, 1080 UI/ml). In nessuno dei casi studiati si è osservata interferenza con il kit VCA IgM.

14. SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA

256 campioni sono stati analizzati con il kit Diesse ed un test proveniente dal commercio. Si sono ottenuti i seguenti risultati:

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	46	6
	-	0	204

Il metodo ENZYWELL risulta avere una sensibilità del 100% ed una specificità del 97.1%.

15. PRECISIONE

Precisione all'interno della seduta eseguita su 3 lotti diversi

<i>Cut-off n=15</i>	<i>Lotto 020</i>	<i>Lotto 021</i>	<i>Lotto 022</i>
<i>D.O.</i>	0.5	0.4	0.4
<i>CV%</i>	7	3	5

Precisione tra sedute e tra lotti

<i>Campione</i>	<i>INDEX</i>			<i>Media</i>	<i>CV%</i>
	<i>Lotto 020</i>	<i>Lotto 021</i>	<i>Lotto 022</i>		
<i>1</i>	<i>0.3</i>	<i>0.4</i>	<i>0.2</i>	<i>0.3</i>	<i>33</i>
<i>2</i>	<i>1.1</i>	<i>1.3</i>	<i>1.2</i>	<i>1.2</i>	<i>8</i>
<i>3</i>	<i>2.5</i>	<i>3.1</i>	<i>2.6</i>	<i>2.7</i>	<i>12</i>

16. GUIDA AI 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 punto 4 per il codice corretto).
Seduta invalida (tutti positivi)		Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test.
	Inquinamento del substrato	Prelevare una nuova aliquota del substrato.
Scarsa precisione	Lavaggio inadeguato	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	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

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).

NIESSE

INSTRUCTIONS FOR USE

ENZYWELL
EPSTEIN BARR VCA IgM

REF 91056

(English)

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC KIT FOR THE SEMIQUANTITATIVE DETERMINATION OF IgM-CLASS ANTIBODIES TO THE VIRAL CAPSID ANTIGEN OF EPSTEIN BARR VIRUS IN HUMAN SERUM, AS AN AID IN THE DIAGNOSIS OF EPSTEIN BARR VIRUS INFECTION.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

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 partially purified EBV antigen is bound to the solid phase. Following incubation with dilute human serum, the specific immunoglobulins are bound to the antigen. The Sorbent M serves to avoid interference by the Rheumatoid Factor.

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. 12x8 wells coated with Epstein Barr Virus antigens.

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

CONJ CONJUGATE 1 x 16 mL

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

Preparation: ready for use.

CAL CALIBRATORS 3 x 1.6 mL

Contents: Diluted human serum, at known concentration of anti-EBV IgM, in Phosphate buffer 0.01 mol/L containing BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution. The titer in arbitrary units, reported on the label, is 20-80-160 AU/ml. The calibrator 1 containing 20 AU/ml corresponds to the cut-off.

Colour: the colour of the calibrators 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 M HUMAN DENATURATED IgG 1 x 7 mL

To be placed in the wells with the samples to neutralize nonspecific reactions (Rheumatoid Factor).

Contents: Phosphate buffered saline (PBS) containing denaturated human IgG and sodium azide 0.09%. Ready for use.

Stability: the product is stable up to the expiry date if stored at 2/8°C.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619) 1x12 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).

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

H₂SO₄ 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
Calibrators	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 M	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 0.9% 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. CO₂ 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

- 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. Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture. Dispense 50 µL of Sorbent M and 50 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED Negative Control and Calibrators in a strip (100 µL in each well without the Sorbent M), preferably in duplicate.

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.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

Leave one well empty for the blank.

- | | |
|--------|---|
| STEP 1 | Place 50 µL of Sorbent M, 50 µL of diluted sample and 100 µL Negative Control and Calibrators 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 (< 0.150) from all the other readings. The Positive Control (CALIBRATOR 3) must have an OD ≥ 1.0 . The ratio between Negative Control and cut-off must be ≤ 0.6 . The O.D. of the Cut-off must be ≥ 0.2 at 450 nm and ≥ 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 (CALIBRATOR 1), the sample is positive for the presence of specific IgM.

Calculate the ratio (INDEX) between the O.D. value of the sample and that of the Cut-off (CALIBRATOR 1). The O.D. of the Cut-off must be ≥ 0.2 at 450 nm and > 0.16 at 450/620 nm.

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.

Semiquantitative results

Arbitrary Units (AU)

The results can be expressed in AU by reporting the OD of the sample on a graph constructed with the 3 calibrators plus the negative control which contains 0 AU/ml.:

- *IMMUNE:* when the concentration of IgM VCA in the sample is > 24 AU/mL
- *NON IMMUNE:* when the concentration is < 16 AU/mL.
- *DOUBTFUL:* when the value is in the range from 16 to 24. In this case it is advisable to repeat the test. If the result remains doubtful, repeat the test after about 2 weeks.

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.

Performance characteristics have not 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.

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

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

14 samples were tested from patients in the acute phase, affected by Cytomegalovirus, Herpes Simplex or Varicella Zoster infections, and also 5 samples containing antibodies anti-DNA. Interference was also studied in highly hemolyzed samples (n=3, 6 g/dl), or containing triglycerides (n=7, up to 1368 mg/dl), bilirubin (n=6, up to 11 mg/dL), Rheumatoid Factor (n=9, 1080 IU/ml). None of the cases studied showed interference with the VCA IgM kit.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

256 samples were tested with the Diesse kit and with another commercial method. The following results were obtained:

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	46	6
	-	0	204

The ENZYWELL method has a sensitivity of 100% and a specificity of 97.1%.

15. PRECISION

"Within run" Precision on three different lots

Cut-off n=15	Lot 020	Lot 021	Lot 022
O.D.	0.5	0.4	0.4

CV%	7	3	5
-----	---	---	---

Precision between runs and between lots

Sample	INDEX			Media	CV%
	Lot 020	Lot 021	Lot 022		
1	0.3	0.4	0.2	0.3	33
2	1.1	1.3	1.2	1.2	8
3	2.5	3.1	2.6	2.7	12

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

PROBLEM	POSSIBLE SOURCE	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 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.
Poor precision	Inadequate washing	Ensure that wash apparatus works well
	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. 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. 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).



INSTRUCCIONES DE USO

ENZYWELL EPSTEIN BARR VCA IgM

REF 91056

(Español)

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE ANTICUERPOS IgM CONTRA EL ANTÍGENO DE LA CAPSIDA VIRAL DEL EPSTEIN-BARR VIRUS EN SUERO HUMANO, COMO UNA AYUDA EN EL DIAGNÓSTICO DEL EPSTEIN BARR.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

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

La diagnosis de laboratorio de IM se hace tradicionalmente por medio de revelación de la presencia en suero de anticuerpos eterófilos aglutinantes los 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 por debajo de los 14 años de edad y además se pueden mantener durante más de un año después de la infección. La sólo búsqueda de anticuerpos eterófilos puede por eso conducir a un diagnóstico erróneo.

Por dicho motivo es importante la búsqueda de anticuerpos dirigidos hacia antígenos virales. En particular, se revela útil la búsqueda de anticuerpos dirigidos hacia el completo 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, constituido por EBV parcialmente purificado está unido a la fase sólida. Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno. El sorbent M evita la interferencia del factor reumatoideo.

Después de varios lavados para eliminar las proteínas que no han reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos monoclonales humanos IgM 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 12x8 pocillos recubiertos de antígenos de Epstein-Barr Virus.

Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (VM, 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 1x16 mL

Contenido: anticuerpos monoclonales humanos anti IgM marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol al 0.05% y Bronidox 0,02%. Listo para su uso sin diluciones adicionales.

CAL CALIBRADORES 3 x 1.6 mL

Contenido Suero humano diluido, a concentración conocida de anticuerpos IgM, en tampón fosfato 0.01 mol/L conteniendo BSA 1% y ázida sódica 0,09%, líquido, listo para su uso sin ulterior dilución. La titulación en unidades arbitrarias, indicado en etiqueta, es 20-80-160 AU/ml. El calibrador 1 con 20 UA/ml corresponde al cut-off.

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 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) 1x100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Contenido: Solución de proteínas (10%) en tampón fosfato con ázida sódica 0.09% con adición de metilnaranja como conservante.

SORBENT M IgG HUMANAS DESNATURALIZADAS (PF91084) 1 x 7 mL
 Poner dentro de los pocillos para la neutralización de las reacciones específicas. (Factor reumatoide)
Contenido: Solución salina tamponada (PBS) conteniente IgG humanas **denaturate** y ázida sódica 0,09%. Listo para su uso.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Listo para su uso **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H₂O₂ 0,01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**
 Solución de H₂SO₄ 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 abertura y/o de la preparación

REACTIVO	CONDICIONES
MICROPLACA	5 SEMANAS 2/8°C bolso de plástico
CALIBRADORES Y 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 fecha de caducidad a 2/8°C
SOLUCIÓN DE LAVADO	listo para su uso 2 semanas 2/8°C 5 días a 15/30 °C
SORBENT M	5 SEMANAS 2/8°C
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la fecha de 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 los 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 hidroc্লórico 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 CO₂.
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 descongeladas antes de la titulación. La inactivación al calor puede proveer resultados erróneos. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbica que conduce a resultados erróneos.

No utilizar muestras muy lipémicas, ictéricas, hemolizadas o contaminadas.

El test no se puede aplicar a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo la solución de lavado 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

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 M y 50 de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los calibradores SIN DILUIR en una tira (100 µL para cada pocillo sin el Sorbent M). El requisito mínimo indispensable es 1 control negativo, 2 cut-off y 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 Sustrato, 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.

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST
--

- | | |
|--------|---|
| STEP 1 | Poner 50 µL de Sorbent M, 50 µL de suero diluido y 100 µL de calibradores y controle 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 Sustrato 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

Restar el valor del blanco (≤ 0.150) a todas las otras lecturas. Los valores en D.O. del suero de control positivo (CALIBRADOR 3) deben estar ≥ 1.0 . La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser ≤ 0.6 . La O.D. 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 (CALIBRADOR 1) la muestra resulta positiva por la presencia de IgG específicas para el antígeno.

Calcular la relación (INDEX) entre el valor de D.O. de la muestra y el del Cut-off (CALIBRADOR 1).

La muestra se considera:

Immune: si la concentración es > 1.2 .

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

No-immune: 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 semicuantitativos

Unidades Arbitrarias (AU)

Los resultados se pueden expresar en unidades arbitrarias indicando la D.O. de la muestra sobre curva constituida por los 3 calibradores más el control negativo que tiene 0 AU/ml.

- *INMUNE*: si la concentración de IgG VCA en la maestra es > 24 UA/mL
- *NO-INMUNE*: si la concentración de IgG anti-VCA es < 16 UA/mL.
- *DUDOSO*: si el valor está entre 16 y 24. En este caso se aconseja repetir la prueba en duplicado. Si el valor continua siendo dudoso, recoger una nueva muestra de sangre después de más o menos 2 semanas.

12. LIMITACIONES

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

Las características de las performances no han sido estudiadas en pacientes afectados por carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt ni por otras linfadenopatías asociadas al EBV, excepto la mononucleosis correlada al EBV.

No puede ser utilizado para la diagnóstico un sólo parámetro. La interpretación cuidadosa de una infección de EBV debe basarse sobre los resultados del VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG, EA IgG ed EA IgM.

El test se efectúa sobre el suero. No se ha establecido la aplicación sobre sangre entera ni sobre plasma.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se analizaron 14 muestras de pacientes en fase aguda afectados por Citomegalovirus o Herpes Simplex o Varicella Zoster, e además 5 muestras conteniendo anticuerpos anti-DNA. Además se estudió la interferencia de muestras altamente hemolizadas (n=3, 6 g/dL) o conteniendo triglicéridos (n=7, hasta 1368 mg/dl), bilirubina (n=6, hasta 11 mg/dL), Factor reumatóideo (n=9, 1080 IU/ml). En ninguno de los casos estudiados se observó interferencia con el kit VCA IgM.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

256 muestras han sido analizadas con el kit Diesse y otro kit comercial. Se obtuvieron los resultados siguientes:

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	46	6
	-	0	204

El kit Enzywell ofrece una sensibilidad del 100% y especificidad del 97.1%.

15. PRECISIÓN

Reproducibilidad intra-ensayo realizada sobre 3 lotes distintos

<i>Cut-off n=15</i>	<i>Lote 020</i>	<i>Lote 021</i>	<i>Lote 022</i>
<i>D.O.</i>	0.5	0.4	0.4
<i>CV%</i>	7	3	5

Precisión entre series y lotes

<i>Muestra</i>	<i>INDEX</i>			<i>Media</i>	<i>CV%</i>
	<i>Lote 020</i>	<i>Lote 021</i>	<i>Lote 022</i>		
<i>1</i>	<i>0.3</i>	<i>0.4</i>	<i>0.2</i>	<i>0.3</i>	<i>33</i>
<i>2</i>	<i>1.1</i>	<i>1.3</i>	<i>1.2</i>	<i>1.2</i>	<i>8</i>
<i>3</i>	<i>2.5</i>	<i>3.1</i>	<i>2.6</i>	<i>2.7</i>	<i>12</i>

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSIBLES FUENTES DE ERROR	PRUEBA U ACCIONES
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.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).



INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ENZYWELL EPSTEIN BARR VCA IgM

REF 91056

(PORTUGUÊS)

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

MÉTODO IMUNO-ENZIMÁTICO PARA A DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DOS ANTICORPOS DE CLASSE IGM AO ANTIGÉNIO CAPSIDO VIRAL (VCA) DO VÍRUS EPSTEIN BARR NO SORO HUMANO, COMO UMA AJUDA NO DIAGNÓSTICO DE EPSTEIN BARR.

2. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O vírus Epstein Barr (EBV) é um vírus do herpes que provoca mononucleose infecciosa (IM). Está também associado a linfoma de Burkitt, carcinoma e síndromes linfáticos proliferativos em pacientes imuno-deprimidos. O vírus está espalhado por todo o mundo e 80-90% da população é seropositiva.

O diagnóstico laboratorial da IM é tradicionalmente efectuado detectando anticorpos heterófilos que se desenvolvem no soro durante o curso da infecção e que aglutinam eritrócitos de equinos. No entanto, estes anticorpos podem não estar sempre presentes em pacientes afectados com IM, particularmente se tiverem menos de 14 anos de idade. Além disso, podem também persistir durante um ano após a infecção. A determinação de anticorpos heterófilos por si só pode, por isso, conduzir a um diagnóstico erróneo. Assim, é importante determinar a presença de anticorpos nos antígenos virais. A detecção de anticorpos dirigidos para o “Antigénio Capsido Viral” (VCA) e o antigénio nuclear (EBNA) é particularmente útil.

Durante o curso da IM, os anticorpos de classe IgM- e IgG- para VCA aparecem precocemente, enquanto que o IgG para EBNA se desenvolve mais tarde durante a infecção. A presença de IgM contra VCA na ausência de IgG contra EBNA indica, portanto, que existe uma infecção corrente, enquanto que a presença de IgG contra VCA e EBNA é indicativa de uma infecção anterior.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

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

O antigénio EBV parcialmente purificado liga-se à fase sólida. As imunoglobulinas específicas são ligadas ao antigénio a seguir à incubação com soro humano diluído. O Sorvente M serve para evitar interferências pelo Factor Reumatóide.

Após as lavagens para eliminar as proteínas que não reagiram, a incubação é efectuada com conjugado, composto de anticorpos IgM humanos monoclonais conjugados 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 E PREPARAÇÃO DO REAGENTE

Os reagentes são suficientes para 96 determinações.

Ponha à temperatura ambiente antes da utilização.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 poços revestidos com antígenos do vírus Epstein Barr.

Utilização: abra a embalagem no lado oposto ao código (VM seguido do número do lote), que é útil para fins de 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 1 x 16 mL

Conteúdo: anticorpos monoclonais para IgM anti-humano marcado com peroxidase, numa solução tampão fosfatada contendo fenol a 0,05% e Bronidox a 0,02%.

Preparação: Pronto a usar.

CAL CALIBRADORES 3 x 1,6 mL

Conteúdo: Soro humano diluído, a uma concentração conhecida de anti-EBV IgM, num tampão fosfatado 0,01 mol/L contendo BSA 1% e azida de sódio 0,09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional. A titulação em unidades arbitrárias, indicada no rotolo, é de 20, 80, 160 UA/ml. O calibrador que contém 20 UA/ml corresponde ao directo.

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) 1x12 mL **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). Pronto a usar.

SAMP DIL 10 DILUENTE 10 (PF93621) 1x100 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 .

SORBENT M IgG HUMANAS DESNATURADAS (PF30031) 1 x 7 mL

A colocar nos poços com as amostras para neutralizar reacções não específicas (Factor Reumatóide).

Conteúdo: Tampão fosfatado salino (PBS) contendo IgG humano desnaturado azida de sódio a 0,09%. Pronto a usar.

Estabilidade: O produto fica estável até ao prazo de validade se armazenado a 2/8°C.

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.

H₂SO₄ 0,3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602) 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

H₂SO₄ 0,3 mol/L, em solução pronta a ser usada.

A ficha de segurança MSDS está disponível para ser fornecida ao pessoal laboratorial que assim o solicitar.

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 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 DE REAGENTES

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

REAGENTE	CONDIÇÕES
Microplaca	5 semanas a 2/8°C, saco de polietileno
Calibradores/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.
Sorbent M	5 semanas a 2/8°C
Solução de Paragem	até ao prazo de validade a 2/8°C.

6. PRECAUCÕES

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

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.

1. 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.
2. Os seguintes reagentes contêm baixas concentrações de substâncias nocivas ou irritantes.
 - a) O tampão de lavagem contém detergentes
 - b) O conjugado e os controlos contêm fenol
 - c) O substrato é ácido
 - d) 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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 analíticas

1. 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 a 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.
2. Não utilize os 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.
3. 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.
4. 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.
5. Não exponha os reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.
6. Não deixe que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.
7. Tenha cuidado para que não haja contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com os vários reagentes.
8. Tenha cuidado para evitar tocar ou salpicar a borda do poço com o conjugado. **Não “sobre” as microplacas.**
9. 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 CO₂ não devem ser utilizados.
10. 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.
11. A utilização de amostras altamente hemolizadas, soros incompletamente coagulados ou amostras com contaminação microbiana pode dar origem a resultados erróneos.
12. O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado por o usuário.
13. 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. TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

A amostra é composta por soro recolhido de maneira normal numa veia e manuseado com todas as precauções ditadas 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, o que leva a resultados erróneos.

Devem evitar-se amostras fortemente lipémicas, contaminadas ou ictéricas.

O teste não é aplicável ao plasma humano.

8. PROCEDIMENTO DE TESTE

- Prepare a quantidade necessária de tiras
- Prepare o tampão de lavagem diluindo-o 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

Amostras diluídas na proporção de 1:26 distribuindo 40 µL de soro em 1mL de diluente. Deixe o primeiro poço para o branco, que será executado distribuindo 100 µL da mistura de substrato. Distribua os calibradores/controlo Negativo NÃO DILUÍDOS nos poços designados (100 µL em cada poço) sem o Sorvente M. O requisito mínimo é 1 controlo negativo, 2 directos e 1 positivo. De seguida, coloque 50 µL de Sorvente M e 50 µl de cada amostra diluída por poço (recomendam-se testes duplicados).

Cubra os poços com filme protector e incube durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar quatro vezes (300 µl com 30 segundos de tempo de enxaguamento para cada ciclo), adicione 100 µL de conjugado em cada poço e volte a incubar durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com filme protector. Lave novamente a placa 4 vezes, como descrito acima. Por fim, distribua 100 µl do substrato em todos os poços (incluindo o primeiro para o branco).

Interrompa a reacção após 15 minutos à temperatura ambiente com 100 µL de solução de paragem.

Leia a densidade óptica (D.O.) a 450 nm ou 450/620 nm e eventualmente a 405 nm, dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE
--

Deixe o primeiro poço vazio para o branco:

- A. Pipete 100 µL de calibradores e controlo nos poços designados
- B. De seguida, pipete 50 µL de Sorvente M e 50 µl de amostra diluída nos poços subsequentes.
- C. Incube durante 45 minutos a 37°C
- D. Lave quatro 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 quatro 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. VALIDAÇÃO DO TESTE

Subtraia o valor do branco (que deve ser $\leq 0,150$) de todas as outras leituras. Os valores D.O. do soro de controlo directo Subtraia o valor do branco (que deve ser $= 0,150$) de todas as outras leituras. O controlo positivo (CALIBRADOR 3) deve ter uma D.O. $\geq 1,0$. 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. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

Se a DO da amostra for maior que a do Directo (CALIBRADOR 1), a amostra é positiva para a presença de IgM específica.

Calcule a relação (INDICE) entre o valor DO da amostra e a do valor directo (CAL 1).

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.

CÁLCULO SEMIQUANTITATIVO

Unidades arbitrárias (UA)

Os resultados podem ser expressos em UA indicando a DO da amostra num grafico, concebido com os 3 calibradores mais o controlo negativo que contém 0 UA/ml:

IMUNE: quando a concentração de IgM VCA na amostra é >24 UA/ml

NÃO IMUNE: quando a concentração é <16 UA/ml

DUVIDOSA: quando o valor está dentro do limite compreendido entre 16 e 24. Neste caso è aconselhavel repetir o teste. Se o resultado permanecer duvidoso, repita o teste ao fim de cerca de 2 semanas.

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.

As características de desempenho não 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.

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

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas 14 amostras de pacientes na fase aguda, afectados com Citomegalovírus, Herpes Simplex ou Varicela Zoster e também 5 amostras contendo anticorpos anti-DNA. A interferência foi também estudada em amostras altamente hemolizadas (n=3, 6 g/dL) o contendo triglicéridos (n=7, até 1368 mg/dl), bilirrubina (n=6, até 11 mg/dL), factor reumatóide (n=9, 1080 IU/ml). Nenhum dos casos estudados mostrou interferências com o kit VCA IgM.

14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

256 amostras foram analisadas com o kit Adaltis e com outro método comercial. Os resultados seguintes foram obtidos:

		REFERÊNCIA	
		+	-
Enzywell	+	46	6
	-	0	204

O método Enzywell tem uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 97,7%.

15. PRECISÃO

Precisão intra-ensaios efectuada em três lotes diferentes

Valor directo n=15.	Lote 020	Lote 021	Lote 022
D.O.	0,5	0,4	0,4
CV%	7	3	5

Precisão entre testes e entre lotes

Amostra	ÍNDICE DIRECTO			Média	CV%
	Lote 020	Lote 021	Lote 022		
1	0,3	0,4	0,2	0,3	33
2	1,1	1,3	1,2	1,2	8
3	2,5	3,1	2,6	2,7	12

16. 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.

PROBLEMA	POSSÍVEIS CAUSAS	TESTE OU ACÇÃO
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. 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).

	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 Fabbicante	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, Italy
Tel. 0577-587111