

ENZY-WELL

Epstein-Barr VCA IgM

REF 91056



DIESSE

DIESSE Diagnostica Senese
S.p.A.
Strada dei Laghi, 39
53035 Monteriggioni (SIENA)
Italy

	Capitolo Section Capítulo
Modifiche introdotte nella revisione corrente Changes introduced in the current revision Eingeführte Änderungen in der vorliegenden Fassung Τροποποιήσεις που εισήχθησαν στην τρέχουσα διόρθωση Cambios introducidos en la revisión actual Modifications apportées à la révision courante Alterações introduzidas na revisão atual	10





ISTRUZIONI PER L'USO

ENZY-WELL Epstein-Barr VCA IgM

Per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi IgM anti-antigene del capside virale del virus Epstein-Barr.

Solo per uso diagnostico in vitro

1. UTILIZZAZIONE

Metodo immunoenzimatico per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi di classe IgM anti-antigene del capside virale del virus Epstein-Barr nel siero umano.

2. INTRODUZIONE

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è un herpesvirus che causa la mononucleosi infettiva (IM). È 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.

È 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-IgM 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 93054-C)

Contenuto: 1 piastra da 96 pozzetti sensibilizzati con antigene sintetico del capsido virale.

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta del codice (EM 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 93571)

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

CAL CALIBRATORI 3x1.6 mL (PF91871 – PF30077 – PF92072)

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.

Il titolo in unità arbitrarie, riportato in etichetta, è 20, 80, 160 AU/ml. Il calibratore 1 con 20 AU/ml corrisponde al Cut-Off. Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONTROL IgG - IgG CONTROLLO NEGATIVO 1x1.6mL (PF93910)

INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Siero umano, non contenente anticorpi IgM anti-antigene del capsido virale del virus Epstein-Barr, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e Sodio Azide 0.09%. Liquido, pronto all'uso.

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 1x100mL (PF93611)

INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con Sodio Azide 0.09% e colorante (metilarancio).

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

SAMP SORBENT 10 SAMPLE SORBENT 10 1x7mL (PF30253)

INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con Sodio Azide 0.09%, colorante (metilarancio) e anticorpi anti-IgG umane.

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, scioglierli 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
CALBRATORI	8 settimane a 2-8°C
CONTROLLO NEGATIVO	8 settimane a 2-8°C
DILUENTE 2	fino alla scadenza a 2-8°C
SAMPLE SORBENT 10	fino alla scadenza 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 erranei.

La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

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 Sample Sorbent 10 per pozzetto e 50 µL di campione diluito (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato).
Dispensare 100 µL di controllo negativo e 100 µL di ciascun calibratore per pozzetto.
Il requisito minimo indispensabile è di 1 controllo negativo e 1 di ogni livello di calibrazione.
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 ENZY-WELL EPSTEIN-BARR VCA IgM

- STEP 1** Mettere 50 µL di Sample Sorbent 10 e 50 µL di siero diluito. Mettere 100 µL di controllo negativo e di ciascun calibratore 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 (< 0.150) a tutte le altre letture.

Controllo negativo: Il rapporto tra la D.O. del controllo negativo e la D.O. del cut-off (Calibratore 1) deve essere ≤ 0.6 .

Controllo positivo (Calibratore 3): deve avere una D.O. ≥ 1.0

Controllo cut-off (Calibratore 1): la D.O. deve essere ≥ 0.2 .

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 319554

Fax: 0039 0577 366605

email: scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

RISULTATI QUALITATIVI

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.

RISULTATI SEMIQUANTITATIVI

Riportare in grafico le D.O. dei calibratori, sottratte dalla D.O. del bianco, in funzione del titolo (AU/ml) di ciascun calibratore.

Ottenere il titolo corrispondente del campione in esame per interpolazione.

Deve essere eseguita una curva standard per ogni seduta.

Il campione sarà giudicato:

POSITIVO: quando il risultato è > 24

DUBBIO: per tutti i valori compresi fra 16 e 24

NEGATIVO: quando il risultato è < 16

In caso di risultato dubbio ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio, ripetere il prelievo dopo 2 settimane circa.

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.

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.

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.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 5 campioni (2 Negativi, 1 a Cut-Off e 2 Positivi) ai quali sono stati aggiunti i seguenti interferenti:

Fattore Reumatoide (44 – 220 IU/ml)

Bilirubina (4.5– 45 mg/dl)

Trigliceridi (10– 250 mg/dl)

Emoglobina (5– 30 mg/ml)

La presenza nel siero in esame di sostanze interferenti sopra riportate non altera il risultato del test.

14. CROSS-REATTIVI

59 campioni, positivi a Toxoplasma, Varicella, Cytomegalovirus, Herpes simplex, Rosolia e ANA sono stati testati.

Non sono state rilevate reazioni crociate significative.

15. STUDI DI COMPARAZIONE

In una sperimentazione sono stati analizzati 485 campioni con il kit Diesse e con un altro kit del commercio.

Di seguito sono schematizzati i dati della sperimentazione:

		Riferimento		
		+	-	Totale
Diesse	+	69	3	72
	-	1	412	413
	Totale	70	415	485

Percent Positive Agreement (~Sensibilità Diagnostica):

98.6% CI_{95%}: 92.3 – 99.7

Percent Negative Agreement: (~Specificità Diagnostica):

99.3% CI_{95%}: 97.9-99.7

16. PRECISIONE E RIPETIBILITA'

Campione	All'interno della seduta		Tra sedute		Tra lotti	
	Media (Index)	CV%	Media (Index)	CV%	Media (Index)	CV%
1	0.4	12.5	0.4	12.5	0.4	-
2	0.5	14.0	0.5	14.0	0.4	15.0
3	0.3	-	0.3	0.0	0.3	-
4	0.9	7.8	0.9	12.2	0.9	6.7
5	0.9	3.3	0.9	14.4	0.9	11.1
6	1.3	6.9	1.2	7.5	1.2	-
7	1.9	7.4	1.9	8.4	1.8	3.3
8	2.3	6.1	2.7	9.3	2.5	6.0
9	3.3	3.9	3.5	8.3	3.4	4.4
10	2.3	5.2	2.5	10.8	2.3	2.6

17. 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.

18. 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).
5. Van Grunsven WM, van Heerde EC, de Haard HJ, Spaan WJ, Middeldorp JM: Gene mapping and expression of two immunodominant Epstein-Barr virus capsid proteins. J Virol. 1993 Jul;67(7):3908-16.

 **DIESSE Diagnostica Senese**
S.p.A.
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (SIENA)
Italy





INSTRUCTIONS FOR USE

ENZY-WELL Epstein-Barr VCA IgM

**For the semiquantitative determination of IgM
antibodies anti- Epstein-Barr viral capsid antigen**

For In Vitro Diagnostic Use Only

1. INTENDED USE

Immunoenzymatic method for the semiquantitative determination of IgM class antibodies to Epstein-Barr viral capsid antigen 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 IgM 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 (PF93054-C)

Content: 1 microplate (96 wells) coated with synthetic viral capsid antigen.

Use: open the package at the opposite end from the code (EM 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 (PF93571)

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

CAL CALIBRATOR 3x1.6 mL (PF91871 – PF30077 – PF92072)

Content: Diluted human serum, containing a known concentration of IgM antibodies, in phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and Sodium Azide 0.09%.

Liquid, ready for use.

The titer in arbitrary units, reported on the label, is 20, 80, 160 AU/ml. Calibrator 1 containing 20 AU/ml corresponds to the cut-off.

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

CONTROL IgG - IgG NEGATIVE CONTROL 1x1.6 mL (PF93910)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Content: Human serum, not containing anti-IgM antibodies anti-Epstein-Barr viral capsid antigen, diluted in phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and Sodium Azide 0.09%. Liquid, ready for use.

SAMP DIL 2 DILUENT 2 1x100 mL (PF93611)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Content: Proteic solution in phosphate buffer with Sodium Azide 0.09% and methyl orange as dye.

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

SAMP SORBENT 10 SAMPLE SORBENT 10 1x7 mL (PF30253)

INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Content: Proteic solution in phosphate buffer with Sodium Azide 0.09%, methyl orange as dye and anti-human IgG antibodies.

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
CALIBRATORS	8 weeks at 2-8°C
NEGATIVE CONTROL	8 weeks at 2-8°C
DILUENT 2	up to the expiry date at 2-8°C
SAMPLE SORBENT 10	up to the expiry date 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 Sample Sorbent 10 per well and 50 µL of diluted sample (duplicate testing is recommended). Dispense 100 µL of negative control and 100 µL of each calibrator per well.
The minimum requisite is 1 negative control and 1 control for each calibration level.
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 ENZY- WELL EPSTEIN-BARR VCA IgM

- STEP 1 Place 50 µL of Sample Sorbent 10 and 50 µL of diluted sample. Place 100 µL of negative control and of each calibrator 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 (< 0.150) from all the other readings.

Negative control: the ratio between the negative control OD and cut-off OD (Calibrator 1) must be ≤ 0.6 .

Positive control (Calibrator 3): the OD must be ≥ 1.0

Cut-off control (Calibrator 1): the OD must be ≥ 0.2 .

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 319554

Fax: 0039 0577 366605

email: scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

QUALITATIVE 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.

SEMIQUANTITATIVE RESULTS

Report on a graph the OD of the calibrators, after subtracting the OD of the blank, for each calibrator titer (AU/ml).

The corresponding titer of the test sample can be obtained by extrapolation.

A standard curve must be performed for each run.

The sample is considered:

POSITIVE: when the result is > 24

DOUBTFUL: for all the values between 16 and 24

NEGATIVE: when the result is < 16

If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, collect a new serum sample about 2 weeks later.

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.

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.

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.

13. ANALITICAL SPECIFICITY

5 samples (2 Negative, 1 Cut-Off and 2 Positive) were spiked with the following potentially interfering factors and then tested:

Rheumatoid factor (44-220 IU/ml)

Bilirubin (4.5-45 mg/dl)

Triglycerides (10-250 mg/dl)

Hemoglobin (5-30 mg/ml)

The presence in the serum sample of the interfering substances described above does not affect the test result.

14. CROSS-REACTIONS

59 samples, positive to Toxoplasma, Varicella, Cytomegalovirus, Herpes simplex, Rubella and ANA were tested.

No significant cross-reactions were found.

15. METHOD COMPARISON

In an experimentation 485 samples have been tested with Diesse kit and with a competitor kit.

Data are summarized in the following table:

		Reference		
		+	-	Total
Diesse	+	69	3	72
	-	1	412	413
	Total	70	415	485

Percent Positive Agreement (~Diagnostic Sensitivity):

98.6% CI_{95%}: 92.3 – 99.7

Percent Negative Agreement (~Diagnostic Specificity):

99.3% CI_{95%}: 97.9.-99.7

16. PRECISION AND REPEATABILITY

Sample	Within-run Precision		Between-run precision		Precision between batches	
	Mean (Index)	CV%	Mean (Index)	CV%	Mean (Index)	CV%
1	0.4	12.5	0.4	12.5	0.4	-
2	0.5	14.0	0.5	14.0	0.4	15.0
3	0.3	-	0.3	0.0	0.3	-
4	0.9	7.8	0.9	12.2	0.9	6.7
5	0.9	3.3	0.9	14.4	0.9	11.1
6	1.3	6.9	1.2	7.5	1.2	-
7	1.9	7.4	1.9	8.4	1.8	3.3
8	2.3	6.1	2.7	9.3	2.5	6.0
9	3.3	3.9	3.5	8.3	3.4	4.4
10	2.3	5.2	2.5	10.8	2.3	2.6

17. 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

18. REFERENCES

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).
5. Van Grunsven WM, van Heerde EC, de Haard HJ, Spaan WJ, Middeldorp JM : Gene mapping and expression of two immunodominant Epstein-Barr virus capsid proteins. J Virol. 1993 Jul;67(7):3908-16.

DIESSE Diagnostica Senese
S.p.A.
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (SIENA)
Italy





GEBRAUCHSANWEISUNG

ENZY-WELL Epstein-Barr VCA IgM

Zur semi-quantitativen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen das virale Kapsid des Epstein-Barr-Virus

Nur zur In-vitro-Diagnostik

19. ANWENDUNG

Immunenzymatisches Verfahren zur semi-quantitativen Bestimmung von Antikörpern der IgM-Klasse gegen das Viruskapsid des Epstein-Barr-Virus in Humanserum.

20. EINLEITUNG

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein Herpesvirus, das die infektiöse Mononukleose (IM) verursacht. Es ist auch mit Burkitt-Lymphom, Nasopharynxkarzinom und lymphoproliferativen Syndromen bei immunsupprimierten Patienten assoziiert. Das Virus ist auf der ganzen Welt verbreitet und 80-90% der Bevölkerung ist HIV-positiv. Die Labordiagnose des IM erfolgt traditionell, indem im Serum heterophile Antikörper nachgewiesen werden, die die roten Blutkörperchen des Pferdes binden, die sich im Verlauf der Krankheit entwickeln. Diese Antikörper können jedoch bei Patienten mit IM nicht vorhanden sein, insbesondere unter 14 Jahren, und zusätzlich können sie über ein Jahr nach der Infektion bestehen bleiben. Die Suche nach heterophilen Antikörpern alleine kann daher zu einer Fehldiagnose führen.

Die Suche nach Antikörpern gegen virale Antigene ist daher wichtig. Insbesondere ist es nützlich, nach Antikörpern zu suchen, die gegen den antigenen Komplex gerichtet sind, der als "Viral Capsid Antigen" (VCA) und Nuclear Antigen (EBNA) bezeichnet wird.

Während des IM treten Anti-VCA-IgM- und IgG-Antikörper früh auf, während sich Anti-EBNA-IgG-Antikörper später entwickeln. Daher deutet das Vorhandensein von Anti-VCA-IgM in Abwesenheit von Anti-EBNA-IgG auf eine fortlaufende Infektion hin, während das Vorhandensein von Anti-VCA- und Anti-EBNA-IgG auf die Diagnose einer früheren Infektion hinweist.

21. PRINZIP DER METHODE

Der Test basiert auf dem ELISA-Prinzip (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Das Antigen ist an die Festphase gebunden. Spezifische Immunglobuline binden sich bei Inkubation mit verdünntem Humanserum an das Antigen. Nach dem Waschen zur Entfernung der nicht reagierten Proteine wird die Inkubation mit dem Konjugat durchgeführt, das aus monoklonalen Anti-Human-IgM-Antikörpern besteht, die an Meerrettichperoxidase konjugiert sind. Das ungebundene Konjugat wird eliminiert und das Peroxidasesubstrat wird zugegeben. Die blaue Farbe, die sich entwickelt, ist proportional

zur Konzentration der im Testserum vorhandenen spezifischen Antikörper.

Wenn die enzymatische Reaktion durch Zugabe einer Schwefelsäurelösung unterbrochen wird, wird die Farbe gelb. Die Farbe, proportional zur Menge der im Serum vorhandenen spezifischen Antikörper, kann in einem Mikroplattenleser abgelesen werden.

22. VORSICHTMAßNAHMEN

NUR ZUR IN-VITRO-DISGNOSTIK

Dieses Kit enthält Materialien menschlichen Ursprungs, die von der FDA für HBsAg- und Anti-HIV-1-, Anti-HIV-2- und Anti-HCV-Antikörper getestet und für negativ befunden wurden. Da kein Diagnosetest eine vollständige Garantie für das Fehlen von Infektionserregern bieten kann, muss jedes Material menschlichen Ursprungs als potenziell infiziert angesehen werden. Alle Reagenzien und Proben müssen gemäß den im Labor üblichen Sicherheitsstandards gehandhabt werden.

Entsorgung von Rückständen: Serumproben und gebrauchte Reagenzien müssen als infizierte Rückstände behandelt und anschließend gemäß den geltenden Gesetzen entsorgt werden.

Warnungen zur persönlichen Sicherheit

9. Nicht mit dem Mund pipettieren.
10. Beim Umgang mit Proben und während des Tests Einweghandschuhe und Augenschutz verwenden.
11. Waschen Sie Ihre Hände nach dem Test gründlich.
12. Informationen zu den Sicherheitsmerkmalen der im Kit enthaltenen Reagenzien finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (auf Anfrage erhältlich).
13. Nicht-wegwerfbare Geräte müssen nach Gebrauch sterilisiert werden, vorzugsweise in einem Autoklav für 1 Stunde bei 121°C. Alle verfügbaren Geräte müssen gemäß den geltenden Vorschriften entsorgt werden.
14. Die zum Waschen der Glaswaren verwendete 2M Salzsäure ist ätzend. Diese Substanzen müssen mit Vorsicht verwendet werden. Bei Berührung mit der Haut oder den Augen gründlich mit Wasser abwaschen.
15. Neutralisierte Säuren und andere flüssige Abfälle müssen durch Zugabe von Natriumhypochlorit in einem ausreichenden Volumen desinfiziert werden, um eine Endkonzentration von mindestens 1% zu erreichen. Eine 30-minütige Exposition mit 1% Natriumhypochlorit sollte ausreichen, um eine wirksame Desinfektion sicherzustellen.
16. Verschüttungen mit potenziell infektiösem Material müssen sofort mit saugfähigem Papier entfernt und der belastete Bereich dekontaminiert werden, z. B. mit 1% Natriumhypochlorit, bevor die Arbeit fortgesetzt wird. Wenn eine Säure vorhanden ist, sollte Natriumhypochlorit nicht verwendet werden, bevor die Fläche getrocknet ist. Alle Materialien, die zur Dekontaminierung versehentlicher Verschüttungen verwendet werden, einschließlich Handschuhe, müssen als potenziell infizierter Abfall entsorgt werden. Autoklavieren Sie keine Materialien, die Natriumhypochlorit enthalten.

Analytische Warnungen

19. Die O.D. des Cut-Offs, der Kontrollen und der Proben kann zwischen den verschiedenen Platten leicht abweichen. Wenn also Streifen unterschiedlicher Platten in derselben Sitzung verwendet werden, auch wenn dieselbe Charge verwendet wird, muss die Abschneidebestimmung wiederholt werden.
20. Bringen Sie alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-30°C). Lagern Sie die Reagenzien sofort nach Gebrauch bei der empfohlenen Lagertemperatur.
Für die Inkubation der Streifen ist eine korrekte Temperaturkontrolle wichtig. Stellen Sie sicher, dass der Thermostat nicht unter 35°C fällt und nicht über 39°C steigt.
21. Öffnen Sie den Beutel mit den Streifen nach mindestens einer halben Stunde bei Raumtemperatur.
22. Verwenden Sie keine Reagenzien nach dem Verfallsdatum. Vermeiden Sie eine mikrobielle Verunreinigung der Reagenzien, da dies die Gültigkeit des Produkts herabsetzt und zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann.
23. Ändern Sie das Verfahren nicht und ersetzen Sie die Reagenzien nicht mit denen anderer Hersteller oder anderer Chargen, es sei denn, es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass das Reagenz zwischen Chargen austauschbar ist. Reduzieren Sie nicht die empfohlenen Inkubationszeiten.
24. Alle für den Test zu verwendenden Glaswaren müssen gründlich mit 2M Salzsäure gewaschen und mit destilliertem oder entionisiertem Wasser gespült werden.
25. Setzen Sie die Reagenzien während der Lagerungs- und Inkubationsphasen keiner starken Beleuchtung oder Hypochlorit-Dämpfen aus.
26. Verhindern Sie das Trocknen der Vertiefungen während des Tests.
27. Vermeiden Sie die Verwendung von Gefriergeräten mit automatischer Abtauung zur Aufbewahrung der Proben.
28. Vermeiden Sie Kreuzkontaminationen zwischen den Reagenzien. Es ist wichtig, "dedizierte" Pipetten für die Verwendung mit dem Substrat und dem Konjugat zu verwenden.
29. Berühren Sie die Kante des Cockpits nicht mit dem Konjugat
30. Blasen Sie nicht auf Mikrotiterplatten.
31. Enzymimmuntests können manchmal eine besondere Wirkung auf den Rand haben ("Randeffekt"). Dieser Effekt kann durch Erhöhung der Luftfeuchtigkeit während der Inkubationsphasen minimiert werden. Die Platten sollten mit den Plattenabdeckungen abgedeckt und bei 37°C oder in einem Wasserbad mit einem Plattenhalter oder in einem Inkubator inkubiert werden. Alternativ können die Platten in einem geeigneten Analysegerät inkubiert werden. Weitere Informationen finden Sie in der jeweiligen Bedienungsanleitung des Geräts. CO₂-Inkubatoren können nicht verwendet werden
32. Bevor Sie die Platte lesen, vergewissern Sie sich, dass der Boden der Platte sauber und trocken ist und sich keine Luftblasen auf der Oberfläche der Flüssigkeit befinden.
33. Die Verwendung von stark hämolysiertem, lipämischem, ikterischem Serum, das nicht vollständig koaguliert ist, oder

Proben, die eine mikrobielle Verschmutzung verursachen, kann eine Fehlerquelle darstellen.

34. Vermeiden Sie die Kontamination der Schächte mit Einweghandschuhstaub.
35. Die Verwendung des Kits mit automatischen Werkzeugen muss vom Benutzer bestätigt werden.
36. Lesen Sie das Benutzerhandbuch für jedes verwendete Instrument und insbesondere in Bezug auf die folgenden Punkte:
 - Installation und besondere Anforderungen
 - Funktionsprinzip, Anweisungen, Vorsichtsmaßnahmen und Risiken
 - Herstellerangaben und Geräteleistung
 - Wartung und technische Unterstützung.

23. ZUSAMMENSETZUNG DES KITS UND VORARBEITUNG DER REAGENZIEN

Die Reagenzien sind ausreichend für 96 Bestimmungen

Bringen Sie die Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur.

MT PLATE MIKROPLATTE 12x8
(PF93054-C)

Inhalt: 1 96-Well-Platte, beschichtet mit synthetischem Viruskapsid-Antigen.

Verwendung: Öffnen Sie das Gehäuse der Platte auf der gegenüberliegenden Seite des Codes (EM gefolgt von der Chargennummer), der zur Identifizierung dient. Nimm die nötige Unterstützung und Streifen. Legen Sie die anderen unbenutzten mit Kieselgel in den Polyethylenbeutel. Lösen Sie die Luft und versiegeln Sie sie durch Drücken auf den Verschluss

CONJ KONJUGIERT 1x16 mL
(PF93571)

Inhalt: humane anti-IgM-monoklonale Antikörper, markiert mit Peroxidase in Phosphatpuffer mit Phenol 0.05% und Bronidox 0.02%. Flüssig, gebrauchsfertig

CAL KALIBRATOREN 3x1.6 mL
(PF91871 – PF30077 – PF92072)

Inhalt: Humanserum mit bekannter Konzentration von IgM-Antikörpern in 0.01 mol / l Phosphatpuffer mit 1% BSA und 0.09% Natriumazid verdünnt.

Flüssig, gebrauchsfertig.

Der auf dem Etikett angegebene Titel in willkürlichen Einheiten beträgt 20, 80, 160 AU/ml. Der Kalibrator 1 mit 20 AU/ml entspricht dem Cut-Off.

Farbe: Die Farbe ist proportional zum Antikörpertiter.

CONTROL IgG - IgG NEGATIVKONTROLL 1x1.6mL
(PF93910)

AUSWECHSELBAR ZWISCHEN LOSEN

Inhalt: Humanserum ohne Anti-IgM-Antikörper gegen das virale Kapsid des Epstein-Barr-Virus, verdünnt in Phosphatpuffer 0.01 Mol/l mit BSA 1% und Natriumazid 0.09%. Flüssig, gebrauchsfertig.

SAMP DIL 2 VERDÜNNER 2 1x100mL
(PF93611)

AUSWECHSELBAR ZWISCHEN LOSEN

Inhalt: Proteic-Lösung in Phosphatpuffer mit Natriumazid 0.09% und Farbstoff (Methylorange).

Verwendung: Zur Verdünnung der Probe verwenden. Flüssig, gebrauchsfertig.

SAMP SORBENT 10 SAMPLE SORBENT 10 1x7mL (PF30253)

AUSWECHSELBAR ZWISCHEN LOSEN

Inhalt: Proteic-Lösung in Phosphatpuffer mit Natriumazid 0.09%, Farbstoff (Methylorange) und Anti-Human-IgG-Antikörpern.

Verwendung: Zur Verdünnung der Probe (in der Vertiefung) verwenden. Flüssig, gebrauchsfertig

WASH BUF 10x PUFFER WASCHEN 10x 1x100 mL (PF93603)

AUSWECHSELBAR ZWISCHEN LOSEN

Inhalt: Die gepufferte Salzlösung (PBS) wurde 10-fach konzentriert und enthielt 0.5% Brij.

Verwendung: Verdünnen Sie das erforderliche Volumen im Verhältnis 1:10 mit destilliertem oder entionisiertem Wasser, um den gebrauchsfertigen Waschlösung zu erhalten. Wenn Kristalle vorhanden sind, lösen Sie diese vor dem Verdünnen bei 37°C.

SUBS TMB SUBSTRAT 1x12 mL

(PF93619)

AUSWECHSELBAR ZWISCHEN LOSEN

Inhalt: Tetramethylbenzidin 0.26 mg/ml und 0.01% H₂O₂ stabilisiert in Citratpuffer 0.05 mol/l (pH 3.8). Flüssig, gebrauchsfertig

H₂SO₄ 0.3 M BLOCKIERUNGSLÖSUNG 1x16 mL (PF93602)

AUSWECHSELBAR ZWISCHEN LOSEN

Inhalt: Lösung von H₂SO₄ 0.3 mol/l Flüssig, gebrauchsfertig

SCHUTZFILM (2).

POLYETHYLEN-UMSCHLAG (1).

ANDERE MATERIALIEN ERFORDERLICH, ABER NICHT GELIEFERT

- Inkubator bei 37-40°C
- Mikropplattenleser (wellenlänge 450 oder 450/620 nm, mit Linearität bis zu DO ≥ 2.000)
- Mikropplattenwäscher (nicht wesentlich), der Volumina zwischen 225-375 µl ausgeben kann
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- Normale Laborglaswaren: Zylinder, Reagenzgläser, usw.
- Mikropipetten, die 10, 100, 1000 µl Lösung sorgfältig auffagen können
- Einweghandschuhe
- Uhr
- 5% ige Natriumhypochloritlösung
- Behälter für die Sammlung potenziell infizierter Materialien
- Saugfähiges Papier

24. LAGERUNG UND STABILITÄT VON REAGENZIEN

Die Reagenzien müssen bei 2-8°C gelagert werden.

Das Verfallsdatum ist auf jeder Komponente und auf dem äußeren Etikett der Verpackung aufgedruckt.

Reagenzien haben nach dem Öffnen und / oder der Zubereitung nur eine begrenzte Stabilität:

MIKROPLATTE	8 Wochen bei 2-8°C in einem Polyethylenbeutel
CONJUGIERT	8 Wochen bei 2-8°C
KALIBRATOREN	8 Wochen bei 2-8°C
NEGATIVKONTROLL	8 Wochen bei 2-8°C
VERDÜNNER 2	bis zum Verfall bei 2-8°C
SAMPLE SORBENT 10	bis zum Verfall bei 2-8°C
SUBSTRAT	bis zum Verfall bei 2-8°C; 1 Woche bei 15-30°C; Im Dunkeln bleiben
PUFFER WASCHEN	2 Wochen bei 2-8°C; 5 Tage bei 15-30°C
BLOCKIERUNGSLÖSUNG	bis zum Verfall bei 2-8°C

25. PROBENTYP UND LAGERUNG

Der Probentyp wird durch Serum dargestellt, das aus Blut gewonnen wurde, das durch normale Venenpunktion entnommen und gemäß den üblichen Laborverfahren behandelt wurde.

Die Folgen der Verwendung anderer biologischer Flüssigkeiten sind nicht bekannt.

Das frische Serum kann 4 Tage bei 2/8°C aufbewahrt werden. für längere Lagerzeiten bei -20°C einfrieren

Die Probe kann bis zu 3 Auftauen durchmachen

Vermeiden Sie die Verwendung von Gefrierschränken zum Abtauen. Nach dem Auftauen die Probe vor dem Dosieren vorsichtig schütteln.

Die Inaktivierung durch Hitze kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

Die Qualität der Probe kann durch mikrobielle Kontamination erheblich beeinträchtigt werden, was zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann.

26. VERFAHREN

VORBEREITUNG

Bevor Sie mit dem Test beginnen, bringen Sie alle Reagenzien auf Raumtemperatur (18-30°C).

- Bereiten Sie die erforderlichen Streifen vor
- Bereiten Sie den Waschlösung vor, indem Sie den 10fachen Waschlösung verdünnen (100 mL + 900 mL H₂O).
- Verdünnen Sie die Proben im Verhältnis 1:26 und geben Sie 40 µl Serum in 1 ml Verdünnungsmittel ab

DURCHFÜHRUNG DES TESTS

11. Verteilung der Proben:

Geben Sie 50 µl Probensorbens 10 pro Vertiefung und 50 µl verdünnte Probe ab (die Analyse sollte vorzugsweise doppelt durchgeführt werden).

Fügen Sie 100 µl der negativen Kontrolle und 100 µl jedes Kalibrators pro Vertiefung hinzu.

Die Mindestanforderung ist 1 Negativkontrolle und 1 von jeder Kalibrierungsstufe.

Belassen Sie eine Vertiefung des weißen Streifens (100 µl Substrat).

12. Inkubation:

Die mit Klebefolie bedeckte Platte 45 Minuten bei 37°C inkubieren.

13. Waschen:
Entfernen Sie die Klebefolie, saugen Sie den Inhalt aller Wells ab und waschen Sie viermal, indem Sie jedes Well mit 300 µl Waschlösung füllen. Warten Sie vor jedem Waschvorgang 30 Sekunden.
14. Konjugiertverteilung:
100 µL Konjugat in jede Vertiefung der Platte geben.
5. Inkubation des Konjugiertes:
Die mit Klebefolie bedeckte Platte 45 Minuten bei 37°C inkubieren.
6. Waschen:
Entfernen Sie die Klebefolie, saugen Sie den Inhalt aller Vertiefungen ab und waschen Sie viermal, indem Sie jede Vertiefung mit 300 µl Waschlösung füllen. Warten Sie vor jedem Waschvorgang 30 Sekunden.
7. Substratverteilung:
Fügen Sie in jede Vertiefung der Platte 100 µl Substrat hinzu.
8. Substratinkubation:
Inkubieren Sie die Platte 15 Minuten bei Raumtemperatur.
9. Stoppen der Reaktion:
Geben Sie 100 µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge wie in Punkt 4 hinzu.
10. Lesung:
Lesen Sie die O.D bei 450 nm oder 450/620 nm innerhalb von 30 min. Lesen Sie erneut bei 405 nm, wenn es O.D. über 2.000.

27. ASSAY-SCHEMA AUF ENZY-WELL-EPSTEIN-BARR-VCA-IgM

- STEP 1 Legen Sie 50 µl Probe Sorbent 10 und 50 µl verdünntes Serum hinzu. Legen Sie 100 µL der Negativkontrolle und jeden Kalibrator in die Vertiefungen des Streifens.
Schütteln.
-
- 45 min inkubieren bei 37°C
-
- 4 mal waschen (300 µL)
-
- STEP 2 Fügen Sie 100 µl Konjugat pro Vertiefung hinzu
-
- 45 min inkubieren bei 37°C
-
- 4 mal waschen (300 µL)
-
- STEP 3 Fügen Sie 100 µL Substrat pro Vertiefung hinzu
-
- 15 min inkubieren bei Raumtemperatur
-
- STEP 4 Fügen Sie 100 µl Stopplösung hinzu
-
- Lesen Sie die D.O. bei 450 nm oder 450/620 nm innerhalb von 30 min.

28. VALIDIERUNG DES TESTS

Entfernen Sie den Blindwert (<0.150) von allen anderen Messwerten.

Negativkontroll: Die Beziehung zwischen dem O.D. der negativen Kontrolle und der O.D. der Abschaltung (Kalibrator 1) muss ≤ 0.6 sein.

Positivkontroll (Kalibrator 3): muss ein O.D. ≥ 1.0

Cut-off Kontroll (Kalibrator 1): muss ein O.D. ≥ 0.2 .

Wenn eines der Ergebnisse der Kontrollseren nicht innerhalb des akzeptablen Bereichs liegt, wiederholen Sie den Test. Wenn das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an den wissenschaftlichen Support.

Tel: 0039 0577 319554

Fax: 0039 0577 366605

email: scientificsupport@diesse.it

29. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

QUALITATIVE ERGEBNISSE

Berechnen Sie das Verhältnis zwischen dem Wert des D.O. der Probe und der des Cut-Off (Index).

Die Probe wird bewertet:

POSITIV: Wenn der Index > 1.2

ZWEIDEUTIG: Für alle Werte $0.8 - 1.2$

NEGATIV: Wenn der Index < 0.8

Im Zweifelsfall den Test wiederholen. Wenn das Ergebnis zweifelhaft bleibt, wiederholen Sie die Sammlung.

SEMI-QUANTITATIVE ERGEBNISSE

Berechnen Sie der O.D. der Kalibratoren, abgezogen von der O.D. Weiß, abhängig vom Titer (AU/ml) jedes Kalibrators.

Erhalten Sie den entsprechenden Titel des Testmusters durch Interpolation.

Für jede Sitzung muss eine Standardkurve erstellt werden.

Die Probe wird bewertet:

POSITIV: Wenn das Ergebnis > 24

ZWEIDEUTIG: Für alle Werte zwischen 16 und 24

NEGATIV: Wenn das Ergebnis < 16

Im Zweifelsfall den Test wiederholen. Bleibt das Ergebnis zweifelhaft, wiederholen Sie die Abholung nach ca. 2 Wochen.

30. BESCHRÄNKUNGEN

Alle ermittelten Werte erfordern eine sorgfältige Interpretation, die sich nicht aus anderen Indikatoren desselben Patienten ergibt.

Der Test kann tatsächlich nicht alleine für eine klinische Diagnose verwendet werden, und das erhaltene Ergebnis muss immer zusammen mit Daten aus der Anamnese des Patienten und/oder anderen diagnostischen Untersuchungen ausgewertet werden.

Die genaue Interpretation einer EBV-Infektion muss auf den Ergebnissen von VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG, EA IgG und EA IgM basieren.

Die Leistungseigenschaften wurden bei Patienten mit Nasopharynxkarzinom, Burkitt-Lymphom oder anderen EBV-assoziierten Lymphadenopathien nicht untersucht, mit Ausnahme der EBV-bedingten Mononukleose.

31. ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

Es wurden fünf Proben getestet (2 Negative, 1 Cut-Off und 2 Positives), zu denen die folgenden Interferenten hinzugefügt wurden:

Rheumafaktor (44 – 220 IU/ml)
 Bilirubin (4.5– 45 mg/dl)
 Triglyceride (10– 250 mg/dl)
 Hämoglobin (5– 30 mg/ml)

Das Vorhandensein der oben aufgeführten Störsubstanzen im Serum ändert das Testergebnis nicht.

32. KREUZREAKTIV

Es wurden 59 Proben getestet, die für Toxoplasma, Varicella, Cytomegalovirus, Herpes simplex, Rosolia und ANA positiv waren.

Es wurden keine signifikanten Kreuzreaktionen nachgewiesen.

33. VERGLEICHSTUDIE

In einer Studie wurden 485 Proben mit dem Diesse-Kit und einem anderen im Handel erhältlichen Kit analysiert.

Die experimentellen Daten sind unten gezeigt:

		Anhaltspunkt		
		+	-	Total
Diesse	+	69	3	72
	-	1	412	413
	Total	70	415	485

Percent Positive Agreement (~diagnostische Sensitivität):

98.6% CI_{95%}: 92.3 – 99.7

Percent Negative Agreement: (~diagnostische Spezifität):

99.3% CI_{95%}: 97.9.-99.7

34. PRÄZISION UND WIEDERHOLBARKEIT

Probe	Im Sitzung		Zwischen Sitzungen		Zwischen Losen	
	Media (Index)	CV%	Media (Index)	CV%	Media (Index)	CV%
1	0.4	12.5	0.4	12.5	0.4	-
2	0.5	14.0	0.5	14.0	0.4	15.0
3	0.3	-	0.3	0.0	0.3	-
4	0.9	7.8	0.9	12.2	0.9	6.7
5	0.9	3.3	0.9	14.4	0.9	11.1
6	1.3	6.9	1.2	7.5	1.2	-
7	1.9	7.4	1.9	8.4	1.8	3.3
8	2.3	6.1	2.7	9.3	2.5	6.0
9	3.3	3.9	3.5	8.3	3.4	4.4
10	2.3	5.2	2.5	10.8	2.3	2.6

35. PROBLEME BENUTZERHANDBUCH

PROBLEM	MÖGLICHE FEHLERQUELLEN	MASSNAHMEN
Ungültige Sitzung (alle negativ)	Ein oder mehrere Reagenzien wurden nicht oder in falscher Reihenfolge hinzugefügt	Überprüfen Sie den Vorgang erneut. Prüfen Sie, ob kein Reagenz hinzugefügt wurde. Wiederholen Sie den Test.

	Unreaktive Platte	Überprüfen Sie den Code auf dem Beutel der Platte (siehe Gebrauchsanweisung)
		Überprüfen Sie die nicht verwendete Platte auf Feuchtigkeit. (Silikagel muss hellgelb sein). Wiederholen Sie den Test.
Ungültige Sitzung (alle positiv)	Substratverschmutzung	Nehmen Sie ein neues Aliquot des Substrats.
	Unzureichendes Waschen	Stellen Sie sicher, dass die Waschmaschine richtig funktioniert.
Schlechte Präzision	Unzureichendes Ansaugen der Brunnen	Stellen Sie sicher, dass die Waschmaschine richtig funktioniert.
	Pipettierfehler	Überprüfen Sie den Pipettenbetrieb
	Reagenzien zu langsam hinzufügen	Trocknen Sie die Platte nicht nach dem Waschen. Fügen Sie die Reagenzien sofort hinzu.
	Vorhandensein von Luftblasen	Vermeiden Sie beim Pipettieren die Bildung von Luftblasen.
	Optischer Pfad nicht klar	Überprüfen Sie die Lichtquelle auf Verschmutzung. Reinigen Sie die Unterseite der Platte mit einem Papiertaschentuch.
Unzureichende Farbentwicklung	Falsche Inkubationszeit oder Temperatur	Temperaturüberwachung und Inkubationszeit prüfen
	Substrat in unzureichendem Volumen hinzugefügt	Überprüfen Sie den Pipettenbetrieb.

36. BIBLIOGRAPHIE

- 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).
- 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).

10. Van Grunsven WM, van Heerde EC, de Haard HJ, Spaan WJ, Middeldorp JM: Gene mapping and expression of two immunodominant Epstein-Barr virus capsid proteins. J Virol. 1993 Jul;67(7):3908-16.



DIESSE Diagnostica Senese
S.p.A.
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (SIENA)
Italien





ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

ENZY-WELL Epstein-Barr VCA IgM

**Για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των
αντισωμάτων IgM κατά του αντιγόνου του
καψιδίου του ιού Epstein-Barr**

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro

1. ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Ανοσοενζυμική μέθοδος για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων της κλάσης IgM κατά του αντιγόνου του καψιδίου του ιού Epstein-Barr στον ανθρώπινο ορό.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ιός Epstein-Barr (EBV) είναι ένας ιός έρπητα που προκαλεί την λοιμώδη μονοπυρήνωση (IM). Συνδέεται επίσης με το λέμφωμα του Burkitt, με το ρινο-φαρυγγικό καρκίνωμα και με την λεμφο-υπερπλασία των ατόμων που πάσχουν από ανοσοκαταστολή. Ο ιός είναι διαδεδομένος σε όλη την υδρόγειο και το 80-90% του πληθυσμού είναι οροθετικό. Η εργαστηριακή διάγνωση της IM γίνεται συνήθως με την ανίχνευση ετερόφιλων αντισωμάτων που αναπτύσσονται στον ορό κατά την διάρκεια της λοίμωξης και προσκολλούνται στα ερυθρά αιμοσφαίρια του ίππου. Παρ' όλα αυτά τέτοια αντισώματα μπορεί να μην είναι παρόντα σε ασθενείς με IM, ειδικά κάτω των 14 ετών και, επιπλέον, μπορούν να παραμείνουν περισσότερο από ένα χρόνο μετά την λοίμωξη. Γι' αυτό τον λόγο η ανίχνευση μόνο των ετερόφιλων αντισωμάτων, μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη διάγνωση.

Είναι λοιπόν σημαντικός ο προσδιορισμός των αντισωμάτων εναντίον ιικών αντιγόνων. Ιδιαίτερα χρήσιμη αποδεικνύεται η ανίχνευση της παρουσίας αντισωμάτων κατά του αντιγονικού συμπλέγματος "Viral Capsid Antigen" (VCA) και του πυρηνικού αντιγόνου (EBNA).

Κατά την διάρκεια του κύκλου της IM τα αντισώματα IgM και IgG αντι-VCA εμφανίζονται πρόωρα, ενώ τα αντισώματα IgG αντι-EBNA αναπτύσσονται αργότερα. Γι' αυτό τον λόγο η παρουσία των IgM αντι-VCA, απουσία των IgG αντι-EBNA, είναι δείγμα λοίμωξης σε εξέλιξη, ενώ η παρουσία των IgG αντι-VCA και αντι-EBNA οδηγεί στη διάγνωση μίας προγενέστερης λοίμωξης.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τεστ βασίζεται στη μέθοδο ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Το αντιγόνο στερεώνεται στη στερεά φάση. Οι συγκεκριμένες ανοσοσφαιρίνες συνδέονται με το αντιγόνο μετά από επώαση με αραιωμένο ανθρώπινο ορό.

Μετά από πλύσεις για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν αντέδρασαν γίνεται η επώαση με το συζυγές, που αποτελείται από μονόκλωνα ανθρώπινα αντισώματα αντι-IgM συζευγμένων με υπεροξειδάση ραφανιδίων. Απομακρύνεται το συζυγές που δεν συνδέθηκε και προστίθεται το υπόστρωμα για την υπεροξειδάση. Το μπλε χρώμα που σχηματίζεται είναι ανάλογο

προς την συγκέντρωση των συγκεκριμένων αντισωμάτων στον ορό υπό εξέταση.

Όταν η ενζυματική αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη ενός διαλύματος θειικού οξέως, ο χρωματισμός γίνεται κίτρινος. Το χρώμα είναι ανάλογο προς την ποσότητα συγκεκριμένων αντισωμάτων που υπάρχουν στον ορό και μπορεί να ανιχνευτεί σε μία συσκευή ανάγνωσης για μικροπλάκες.

4. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO.

Αυτό το kit περιέχει υλικά ανθρώπινης προέλευσης που έχουν περάσει από τεστ και έχουν βρεθεί αρνητικά, για την ανίχνευση τόσο του HbsAg όσο και των αντισωμάτων anti-HIV-1, anti-HIV-2 και anti-HCV. Επειδή κανένα διαγνωστικό τεστ δεν μπορεί να προσφέρει απόλυτη εγγύηση απουσίας μολυσματικών παραγόντων, οποιοδήποτε υλικό ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να θεωρείται ως δυνητικά μολυσμένο. Τα αντιδραστήρια και τα δείγματα πρέπει να τα χειρίζεστε όλα σύμφωνα με τους κανονισμούς ασφαλείας που συνήθως εφαρμόζονται στο εργαστήριο.

Διάθεση κατάλοιπων: τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να αντιμετωπίζονται ως μολυσμένα κατάλοιπα και επομένως να διατίθενται σύμφωνα με τις διατάξεις των ισχύοντων νόμων.

Οδηγίες για την προσωπική ασφάλεια

1. Μην κάνετε αναρρόφηση με το στόμα.
2. Χρησιμοποιείτε γάντια μίας χρήσης και προστατεύετε τα μάτια όταν χειρίζεστε τα δείγματα και κατά την διάρκεια της δοκιμής.
3. Πλένετε σχολαστικά τα χέρια αφού τελειώσει το τεστ.
4. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά ασφαλείας των αντιδραστηρίων που περιέχονται στο kit συμβουλευστε το Δελτίο Ασφαλείας (διαθέσιμο κατόπιν αιτήματος).
5. Οι συσκευές που δεν είναι μίας χρήσης πρέπει να αποστειρώνονται μετά από την χρήση, τοποθετώντας τις σε κλίβανο για μία ώρα στους 121°C; όλες οι συσκευές μίας χρήσης πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους ισχύοντες κανονισμούς.
6. Το υποχλωρικό οξύ 2M που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των υάλινων υλικών είναι διαβρωτικό; τέτοιες ουσίες πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή. Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα ή τα μάτια, πλύνετε με άφθονο νερό.
7. Ουδετεροποιημένα οξέα και άλλα υγρά απόβλητα πρέπει να απολυμαίνονται προσθέτοντας υποχλωριώδες νάτριο, τόσο όσο χρειάζεται ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι τουλάχιστον 1%. Η έκθεση στο υποχλωριώδες νάτριο 1% για 30 λεπτά θα πρέπει να είναι αρκετή για να εγγραφεί μία αποτελεσματική απολύμανση.
8. Τυχόν χυμένα υλικά που θα μπορούσαν να είναι μολυσμένα πρέπει να καθαρίζονται αμέσως με απορροφητικό χαρτί και η μολυσμένη περιοχή πρέπει να απολυμαίνεται, για παράδειγμα με υποχλωριώδες νάτριο 1%, πριν να συνεχίσετε την εργασία. Σε περίπτωση παρουσίας ενός οξέος, το υποχλωριώδες νάτριο δεν πρέπει να χρησιμοποιείται πριν να έχει στεγνώσει η περιοχή. Πρέπει όλα τα υλικά, καθώς και γάντια, που χρησιμοποιήθηκαν για να απολυμανθούν τυχόν χυμένα υγρά από ατύχημα, να

απορρίπτονται ως δυνητικά μολυσμένα απόβλητα. Μην βάζετε στον κλίβανο υλικά που περιέχουν υποχλωριώδες νάτριο.

Αναλυτικές οδηγίες

1. Το D.O. του Cut-Off, των ελέγχων και των δειγμάτων μπορεί να είναι ελαφρώς διαφορετικό ανάμεσα στις διάφορες πλάκες. Επομένως, αν στην ίδια διαδικασία χρησιμοποιούνται ταινίες από διαφορετικές πλάκες, ακόμα και της ίδιας παρτίδας, είναι απαραίτητο να επαναληφθεί ο προσδιορισμός του Cut-Off.
2. Πριν από την χρήση, φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C). Επανατοποθετήστε τα αντιδραστήρια στη συνιστώμενη θερμοκρασία διατήρησης αμέσως μετά τη χρήση. **Είναι σημαντικό να υπάρχει ένα σωστό σύστημα θερμοστατικού ελέγχου για την επώαση των ταινιών. Ελέγχετε τον θερμοστάτη ώστε να μην κατεβαίνει κάτω από τους 35°C και πάνω από τους 39°C.**
3. Ανοίγετε την σακούλα που περιέχει τις ταινίες τουλάχιστον μετά από μισή ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
4. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά από την ημερομηνία λήξης. Αποφεύγετε την μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων καθώς μειώνει την εγκυρότητα του προϊόντος και μπορεί να προκαλέσει λανθασμένα αποτελέσματα.
5. Μην τροποποιείτε την Διαδικασία, ούτε αντικαταστήτε τα αντιδραστήρια με εκείνα άλλων παραγωγών ή άλλων παρτίδων, εκτός αν υπάρχει συγκεκριμένη υπόδειξη ότι το αντιδραστήριο είναι εναλλάξιμο μεταξύ παρτίδων. Μην μειώνετε τον χρόνο της επώασης που συνιστάται.
6. Όλα τα υάλινα υλικά που χρησιμοποιούνται στο τεστ πρέπει να πλένονται σχολαστικά με υδροχλωρικό οξύ 2M και να ξεπλένονται με απεσταγμένο ή αποιονισμένο νερό.
7. Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε ισχυρό φωτισμό ούτε σε υποχλωριώδεις ατμούς, κατά την διατήρηση και κατά τα στάδια επώασης.
8. Αποφεύγετε την ξήρανση των κυψελίδων κατά την διάρκεια του τεστ.
9. Αποφεύγετε την χρήση ψυκτών αυτόματης απόψυξης για την διατήρηση των δειγμάτων.
10. Αποφεύγετε την διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των αντιδραστηρίων. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιείτε μικροπιπέτες που προορίζονται για την συγκεκριμένη χρήση με το υπόστρωμα και το συζυγές.
11. Αποφεύγετε να αγγίζετε το περίγραμμα της κυψελίδας με το συζυγές.
12. Μην φυσάτε πάνω στις μικροπλάκες.
13. Οι ανοσοενζυμικές δοσολογίες μπορούν κάποτε να παρουσιάσουν ένα συγκεκριμένο φαινόμενο στο περίγραμμα ("edge effect"), το οποίο μπορεί να ελαχιστοποιηθεί αυξάνοντας την υγρασία κατά την επώαση. Οι πλάκες πρέπει να καλύπτονται με το ειδικό κάλυμμα και να επωάζονται στους 37°C ή σε ζεστό υδατόλουτρο, χρησιμοποιώντας ένα στήριγμα για τις πλάκες, ή στη συσκευή επώασης. Εναλλακτικά, οι πλάκες μπορούν να επωαστούν σε έναν κατάλληλο αναλύτη. Για περισσότερες λεπτομέρειες, συμβουλευέστε το ειδικό εγχειρίδιο λειτουργίας της συσκευής. Μην χρησιμοποιείτε συσκευές επώασης που λειτουργούν με CO₂.

14. Πριν από την ανάγνωση της πλάκας, βεβαιωθείτε ότι ο πυθμένας της είναι καθαρός και στεγνός και ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στην επιφάνεια του υγρού.
15. Η χρήση έντονα αιμολυμένων, λυπαιμικών, ικτερικών δειγμάτων καθώς και δειγμάτων των οποίων ο ορός δεν έχει πήξει εντελώς ή δειγμάτων που παρουσιάζουν μικροβιακή μόλυνση μπορεί να προκαλέσει λάθη.
16. Αποφεύγετε την μόλυνση των κυψελίδων από την σκόνη των γαντιών μίας χρήσης.
17. Η χρήση του kit με αυτόματα μέσα πρέπει να επικυρωθεί από πλευράς του χρήστη.
18. Διαβάστε το Εγχειρίδιο Χρήστη όσον αφορά το κάθε χρησιμοποιούμενο εργαλείο και ειδικά όσον αφορά τα εξής σημεία:
 - εγκατάσταση και ειδικές προϋποθέσεις
 - λειτουργική αρχή, οδηγίες, προφυλάξεις, κίνδυνοι
 - ειδικές πληροφορίες του κατασκευαστή και απόδοση της συσκευής
 - συντήρηση και τεχνική υποστήριξη.

5. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα αντιδραστήρια αρκούν για 96 προσδιορισμούς

Φέρετε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από την χρήση.

MT PLATE ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΑ 12x8
(PF93054-C)

Περιεχόμενο: 1 πλάκα από 96 κυψελίδες ευαισθητοποιημένες με συνθετικό αντιγόνο του ιού κασιδίου

Χρήση: Ανοίξτε την συσκευασία της πλάκας από την αντίθετη πλευρά του κωδικού (EM μετά τον οποίο βρίσκεται ο αριθμός παρτίδας) που εξυπηρετεί στην αναγνώριση της; πάρτε το στήριγμα και τις ταινίες που χρειάζονται. Επανατοποθετήστε τις άλλες που δεν χρησιμοποιήθηκαν στην σακούλα πολυαιθυλενίου με πυριτική γέλη (silica gel); αφαιρέστε τον αέρα και σφραγίστε πιέζοντας στο σημείο κλεισίματος.

CONJ ΣΥΖΥΓΕΣ 1x16 mL
(PF93571)

Περιεχόμενο: ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-IgM μαρκαρισμένα με υπεροξειδάση σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που εμπεριέχει φαινόλη 0.05% και Bronidox 0.02%. Υγρό, έτοιμο για χρήση.

CAL ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΗΣ 3x1.6 mL
(PF91871 – PF30077 – PF92072)

Περιεχόμενο: Ανθρώπινος ορός με γνωστή συγκέντρωση αντισωμάτων IgM, αραιωμένος σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και Αζίδιο Νατρίου 0.09%. Υγρός, έτοιμος για χρήση.

Ο τίτλος, σε αυθαίρετες μονάδες, που αναγράφεται στην ετικέτα, είναι 20-80-160 AU/ml. Ο Βαθμονομητής 1 με 20 AU/ml αντιστοιχεί στον cut-off.

Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αντισωμάτων.

CONTROL IgG - IgG ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ 1x1.6 mL
(PF93910)

ΕΝΑΛΛΑΞΙΜΟ ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΡΤΙΔΩΝ

Περιεχόμενο: Ανθρώπινος ορός που δεν εμπεριέχει αντισώματα IgM αντι-αντιγονού του καψιδίου του ιού Epstein-Barr, αραιωμένος σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και Αζίδιο Νατρίου 0.09%. Υγρός, έτοιμος για χρήση.

SAMP DIL 2 ΔΙΑΛΥΤΙΚΟ 2 1x100 mL
(PF93611)

ΕΝΑΛΛΑΞΙΜΟ ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΡΤΙΔΩΝ

Περιεχόμενο: Πρωτεϊνικό διάλυμα με φωσφορικό ρυθμιστή με Αζίδιο Νατρίου 0.09% και χρωστική ουσία (πορτοκαλί του μεθυλίου).

Χρήση: Να χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων. Υγρό, έτοιμο για χρήση.

SAMP SORBENT 10 SAMPLE SORBENT 10 1x7 mL
(PF30253)

ΕΝΑΛΛΑΞΙΜΟ ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΡΤΙΔΩΝ

Περιεχόμενο: Πρωτεϊνικό διάλυμα με φωσφορικό ρυθμιστή με Αζίδιο Νατρίου 0.09%, χρωστική ουσία (πορτοκαλί του μεθυλίου) και ανθρώπινα αντισώματα αντι-IgG.

Χρήση: Να χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων (στην κυψελίδα). Υγρό, έτοιμο για χρήση.

WASH BUF 10x ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΛΥΣΗΣ 10x 1x100 mL
(PF93603)

ΕΝΑΛΛΑΞΙΜΟ ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΡΤΙΔΩΝ

Περιεχόμενο: Ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (PBS) συγκεντρωμένη 10 φορές που εμπεριέχει Brij 0.5%.

Προετοιμασία: Αραιώνετε τον απαιτούμενο όγκο 1:10 με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό για να είναι έτοιμο το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης για χρήση. Αν υπάρχουν κρύσταλλοι, διαλύστε τους σε θερμοκρασία 37°C πριν την αραιώση.

SUBS TMB ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ 1x12 mL
(PF93619)

ΕΝΑΛΛΑΞΙΜΟ ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΡΤΙΔΩΝ

Περιεχόμενο: Τετραμεθυλοβενζιδίνη 0.26 mg/mL και H₂O₂ 0.01% σταθεροποιημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέως 0.05 mol/L (pH 3.8). Υγρό, έτοιμο για χρήση.

H₂SO₄ 0.3 M ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (BLOCKING SOLUTION) 1x16 mL
(PF93602)

ΕΝΑΛΛΑΞΙΜΟ ΜΕΤΑΞΥ ΠΑΡΤΙΔΩΝ

Περιεχόμενο: Διάλυμα H₂SO₄ 0.3 mol/L. Υγρό, έτοιμο για χρήση.

ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΤΑΙΝΙΑ (2).
ΣΑΚΟΥΛΑ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟΥ (1).

ΑΛΛΟ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ ΥΛΙΚΟ ΠΟΥ ΟΜΩΣ ΔΕΝ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΤΑΙ.

- Επώαστής σε 37-40°C
- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών (μήκος κύματος 450 ή 450/620 nm, με γραμμικότητα μέχρι OD. ≥ 2.000)
- Συσκευή πλύσης μικροπλακών (μη απαραίτητη) με ικανότητα χειρισμού όγκων μεταξύ 225-375 μ l
- Αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- Συνηθισμένος υάλινος εξοπλισμός εργαστηρίου: κύλινδροι, δοκιμαστικοί σωλήνες κλπ.

- Μικροπιπέτες που μπορούν να αναρροφήσουν με ακρίβεια 10, 100, 1000 μ l διαλύματος
- Γάντια μίας χρήσης
- Χρονόμετρο
- Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5%
- Δοχεία για την απόρριψη δυνητικά μολυσμένων υλικών.
- Απορροφητικό χαρτί

6. ΤΡΟΠΟΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα αντιδραστήρια πρέπει να διατηρούνται στους 2/8°C.

Η ημερομηνία λήξης είναι τυπωμένη σε κάθε συστατικό μέρος και πάνω στην εξωτερική ετικέτα της συσκευασίας.

Τα αντιδραστήρια έχουν περιορισμένη σταθερότητα μετά το άνοιγμα και/ή την προετοιμασία:

ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΑ	8 εβδομάδες στους 2/8°C μέσα στην σακούλα πολυαιθυλενίου
ΣΥΖΥΓΕΣ	8 εβδομάδες στους 2/8°C
ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΗΣ	8 εβδομάδες στους 2-8°C
ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	8 εβδομάδες στους 2-8°C
ΔΙΑΛΥΤΙΚΟ 2	μέχρι την λήξη στους 2-8°C
SAMPLE SORBENT 10	μέχρι την λήξη στους 2-8°C
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	μέχρι την λήξη στους 2-8°C;
	1 εβδομάδα στους 15-30°C;
	διατηρείται στο σκοτάδι
ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΛΥΣΗΣ	2 εβδομάδες στους 2-8°C; 5
ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ	ημέρες στους 15-30°C
(BLOCKING SOLUTION)	μέχρι την λήξη στους 2-8°C

7. ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ

Το είδος δείγματος αποτελείται από ορό που προέρχεται από αίμα που λήφθηκε με κανονική φλεβοκέντηση και που έχει περάσει από τις διαδικασίες που απαιτούνται από τους καθιερωμένους κανονισμούς εργαστηρίου.

Δεν είναι γνωστές οι επιπτώσεις από την χρησιμοποίηση άλλων βιολογικών υγρών.

Ο φρέσκος ορός μπορεί να διατηρηθεί για 4 ημέρες στους 2/8°C; για μεγαλύτερη χρονική περίοδο καταψύξετε στους -20°C.

Το δείγμα μπορεί να αποψυχθεί το πολύ 3 φορές.

Αποφεύγετε τη χρήση ψυγείων με αυτόματη απόψυξη για την διατήρηση των δειγμάτων. Μετά από την απόψυξη ανακινήστε το δείγμα με προσοχή πριν την δοσομέτρηση..

Η απενεργοποίηση στην θερμότητα μπορεί να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα.

Η ποιότητα του δείγματος μπορεί να επηρεαστεί σοβαρά από την μικροβιακή μόλυνση η οποία μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Πριν την έναρξη του τεστ, φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C).

- Ετοιμάστε τις απαραίτητες ταινίες.
- Ετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης αραιώνοντας το Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

- Αραιώστε τα δείγματα 1:26 βάζοντας 40 µL ορού σε 1 mL διαλυτικού.

ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

1. Διανομή των δειγμάτων:
Βάλτε 50 µL Sample Sorbent 10 και 50 µL από κάθε αραιωμένο δείγμα (είναι προτιμητέο η ανάλυση να πραγματοποιείται εις διπλούν).
Βάλτε 100 µL αρνητικού ελέγχου και 100 µL βαθμονομητή στην κάθε κυψελίδα.
Η ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα είναι 1 αρνητικός έλεγχος και 1 του κάθε επιπέδου βαθμονόμησης. Αφήστε μία κυψελίδα της ταινίας για το τυφλό δείγμα (100 µL υποστρώματος).
2. Επώαση:
Επώαστε την πλάκα καλυμμένη με κολλώδες φύλλο στους 37°C για 45 λεπτά.
3. Πλύση:
Αφαιρέστε το κολλώδες φύλλο, ανορροφήστε το περιεχόμενο όλων των κυψελίδων και πλύνετε 4 φορές γεμίζοντας κάθε κυψελίδα με 300 µL διαλύματος πλύσης. Περιμένετε 30 δευτερόλεπτα πριν την κάθε πλύση.
4. Διανομή του συζυγούς:
Βάλτε 100 µL συζυγούς στην κάθε κυψελίδα της πλάκας.
5. Επώαση του συζυγούς:
Επώαστε την πλάκα καλυμμένη με κολλώδες φύλλο στους 37°C για 45 λεπτά.
6. Πλύση:
Αφαιρέστε το κολλώδες φύλλο, ανορροφήστε το περιεχόμενο όλων των κυψελίδων και πλύνετε 4 φορές γεμίζοντας κάθε κυψελίδα με 300 µL διαλύματος πλύσης. Περιμένετε 30 δευτερόλεπτα πριν την κάθε πλύση.
7. Διανομή του υποστρώματος:
Βάλτε 100 µL υποστρώματος στην κάθε κυψελίδα της πλάκας.
8. Επώαση του υποστρώματος:
Επώαστε την πλάκα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά.
9. Παύση της αντίδρασης:
Βάλτε 100 µL διαλύματος παρεμπόδισης ακολουθώντας την ίδια σειρά προσθήκης όπως υποδεικνύει το σημείο 4.
10. Ανάγνωση:
Διαβάστε τα D.O. στα 450 nm ή 450/620 nm εντός 30 λεπτών. Ξαναδιαβάστε στα 405 nm αν υπάρχουν D.O. άνω των 2.000.

9. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΓΙΑ ENZY-WELL EPSTEIN-BARR VCA IgM

- ΣΤΑΔΙΟ 1^ο Τοποθετήστε 50 µL Sample Sorbent 10 και 50 µL αραιωμένου ορού. Τοποθετήστε 100 µL αρνητικού ελέγχου και βαθμονομητή στις κυψελίδες της ταινίας. Ανακινήστε.

-
Επώαστε 45 λεπτά στους 37°C

-
Πλύνετε 4 φορές (300 µL)

-

- ΣΤΑΔΙΟ 2^ο Τοποθετήστε 100 µL συζυγούς στην κάθε κυψελίδα

-
Επώαστε 45 λεπτά στους 37°C

-
Πλύνετε 4 φορές (300 µL)

-

- ΣΤΑΔΙΟ 3^ο Τοποθετήστε 100 µL Υποστρώματος στην κάθε κυψελίδα

-

Επώαστε 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

-

- ΣΤΑΔΙΟ 4^ο Προσθέστε 100 µL Διαλύματος Παύσης

-

Διαβάστε το D.O. στα 450 nm ή 450/620 nm εντός 30 λεπτών.

10. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Αφαιρέστε την τιμή του τυφλού δείγματος (< 0.150) σε όλες τις άλλες αναγνώσεις.

Αρνητικός έλεγχος: Η σχέση μεταξύ του D.O. του αρνητικού ελέγχου και του D.O. του cut-off (Βαθμονομητή 1) πρέπει να είναι ≤ 0.6 .

Θετικός έλεγχος (Βαθμονομητή 3): πρέπει να έχει ένα D.O. ≥ 1.0 .
Έλεγχος cut-off (Βαθμονομητή 1): το D.O. πρέπει να είναι ≥ 0.2 .

Αν ένα από τα αποτελέσματα των ορών ελέγχου δεν περιλαμβάνεται μέσα στα αποδεκτά όρια, επαναλάβετε το τεστ. Αν το πρόβλημα εξακολουθεί να υπάρχει επικοινωνήστε με το Τμήμα Επιστημονικής Υποστήριξης.

Τηλ.: 0039 0577 319554

Φαξ: 0039 0577 366605

email: scientificsupport@diesse.it

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογίστε την σχέση μεταξύ της τιμής του OD του δείγματος και εκείνου του Cut-Off (Index).

Το δείγμα θα κριθεί:

ΘΕΤΙΚΟ: όταν ο Δείκτης (Index) είναι > 1.2

ΑΜΦΙΒΟΛΟ: για όλες τις τιμές 0.8-1.2

ΑΡΝΗΤΙΚΟ: όταν ο Δείκτης είναι < 0.8

Σε περίπτωση αμφιβόλου αποτελέσματος επαναλάβετε το τεστ. Αν το αποτέλεσμα παραμένει αμφίβολο, επαναλάβετε την λήψη.

ΗΜΙΠΟΣΟΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μεταφέρετε το γράφημα των D.O. των βαθμονομητών, που έχουν αφαιρεθεί από το D.O. του τυφλού δείγματος, σε συνάρτηση με τον χαρακτηρισμό (AU/ml) του κάθε βαθμονομητή.

Βρίσκετε τον ανάλογο χαρακτηρισμό του δείγματος υπό εξέταση μέσω παρεμβολής.

Πρέπει να διεξαχθεί μία καμπύλη με τον καθιερωμένο τρόπο για κάθε διαδικασία.

Το δείγμα θα κριθεί:

ΘΕΤΙΚΟ: όταν το αποτέλεσμα είναι > 24 .

ΑΜΦΙΒΟΛΟ: για όλες τις τιμές που κυμαίνονται μεταξύ 16 και 24.

ΑΡΝΗΤΙΚΟ: όταν το αποτέλεσμα είναι < 16 .

Σε περίπτωση αμφιβόλου αποτελέσματος επαναλάβετε το τεστ. Αν το αποτέλεσμα παραμένει αμφίβολο, επαναλάβετε την αιμοληψία μετά από 2 εβδομάδες περίπου.

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η κάθε τιμή που λήφθηκε πρέπει να ερμηνεύεται προσεκτικά χωρίς να εξαιρούνται άλλες ενδείξεις που αφορούν τον ίδιο ασθενή.

Το τεστ, πράγματι, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μία κλινική διάγνωση και το αποτέλεσμα πρέπει πάντα να αξιολογείται σε συνδιασμό με δεδομένα που προέρχονται από το ιστορικό του ασθενούς και/ή από άλλες διαγνωστικές έρευνες.

Η ακριβής διάγνωση μίας λοίμωξης από EBV πρέπει να βασίζεται στα αποτελέσματα των VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG, EA IgG και EA IgM

Τα χαρακτηριστικά της ανάλυσης δεν μελετήθηκαν σε ασθενείς που έπασχαν από ρινο-φαρυγγικό καρκίνωμα, από λέμφωμα του Burkitt, ούτε από άλλες λεμφαδενοπάθειες που συνδέονται με τον EBV, εκτός από την μονοπυρήνωση που συνδέεται με τον EBV.

13. ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Έχουν εξετασθεί 5 δείγματα (2 Αρνητικά, 1 στο Cut-Off και 2 Θετικά) στα οποία έχουν προστεθεί οι ακόλουθες παρεμβατικές ουσίες:

Ρευματοειδής παράγοντας (44-220 IU/ml)

Χολερυθρίνη (4.5-45 mg/dl)

Τριγλυκερίδια (10-250 mg/dl)

Αιμοσφαιρίνη (5-30 mg/ml)

Η παρουσία των προαναφερθέντων παρεμβατικών ουσιών στον εξεταζόμενο ορό δεν μεταβάλλει το αποτέλεσμα του τεστ.

14. ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Έχουν εξετασθεί 59 δείγματα, θετικά σε Toxoplasma, Varicella, Cytomegalovirus, Herpes simplex, Rubella, ANA.

Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διασταυρούμενες αντιδράσεις.

15. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Κατά τη διεξαγωγή ενός πειράματος αναλύθηκαν 485 δείγματα με το kit Diesse και με ένα άλλο kit του εμπορίου.

Παρακάτω έχουν σκιαγραφηθεί τα δεδομένα του πειράματος:

		Αναφορά		
		+	-	Σύνολο
Diesse	+	69	3	72
	-	1	412	413
	Σύνολο	70	415	485

Percent Positive Agreement (~Διαγνωστική ευαισθησία):

98.6% CI_{95%}: 92.3 – 99.7

Percent Negative Agreement: (~Διαγνωστική ειδικότητα):

99.3% CI_{95%}: 97.9-99.7

16. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ

Δείγμα	Κατά την διαδικασία		Μεταξύ διαδικασιών		Μεταξύ παρτίδων	
	Μέση Τιμή (Index)	CV%	Μέση Τιμή (Index)	CV%	Μέση Τιμή (Index)	CV%
1	0.4	12.5	0.4	12.5	0.4	-
2	0.5	14.0	0.5	14.0	0.4	15.0
3	0.3	-	0.3	0.0	0.3	-
4	0.9	7.8	0.9	12.2	0.9	6.7
5	0.9	3.3	0.9	14.4	0.9	11.1
6	1.3	6.9	1.2	7.5	1.2	-
7	1.9	7.4	1.9	8.4	1.8	3.3
8	2.3	6.1	2.7	9.3	2.5	6.0
9	3.3	3.9	3.5	8.3	3.4	4.4
10	2.3	5.2	2.5	10.8	2.3	2.6

17. ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ ΧΡΗΣΗΣ

ΠΡΟΒΛΗΜΑ	ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ ΛΑΘΟΥΣ	ΤΡΟΠΟΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ
Άκυρη διαδικασία (όλα αρνητικά)	Ένα ή περισσότερα αντιδραστήρια δεν έχουν προστεθεί ή έχουν προστεθεί με λάθος σειρά	Ελέγξτε ξανά την διαδικασία. Ελέγξτε αν κάποιο αντιδραστήριο δεν έχει προστεθεί. Επαναλάβετε το τεστ.
	Μη αντιδρώσα πλάκα	Ελέγξτε τον κωδικό πάνω στην σακούλα της πλάκας (βλ. οδηγίες για την χρήση).
		Ελέγξτε την παρουσία υγρασίας στην πλάκα που δεν χρησιμοποιήθηκε. (Η πυριτική γέλη πρέπει να είναι κίτρινο ώχρα). Επαναλάβετε το τεστ.
Άκυρη διαδικασία (όλα θετικά)	Μόλυνση του υποστρώματος	Πάρτε ένα άλλο ποσοστό υποστρώματος.
	Ανεπαρκής πλήση	Βεβαιωθείτε ότι η συσκευή πλήσης λειτουργεί σωστά
Ανεπαρκής ακρίβεια	Ανεπαρκής αναρρόφηση των κυψελίδων	Βεβαιωθείτε ότι η συσκευή πλήσης λειτουργεί σωστά
	Λάθος της αναρρόφησης με πιπέτα	Ελέγξτε την λειτουργία της πιπέτας
	Υπερβολικά αργή πρόσθηκη των αντιδραστηρίων	Αποφεύγετε την ξήρανση της πλάκας μετά την πλήση. Προσθέστε τα αντιδραστήρια αμέσως.
	Παρουσία φυσαλίδων αέρα	Αποφύγετε την δημιουργία φυσαλίδων αέρα κατά την διάρκεια της αναρρόφησης με πιπέτα

	Μη διαυγής οπτική ένδειξη	Ελέγξτε την φωτινή πηγή για την παρουσία ακαθαρσίας. Καθαρίστε τον πυθμένα της πλάκας με ένα χαρτομάνηλο.
Ανεπαρκής σχηματισμός χρώματος	Λάθος χρόνος ή θερμοκρασία επώασης	Επιβλέπετε την θερμοκρασία και τον χρόνο επώασης
	Το υπόστρωμα που προστέθηκε στον όγκο δεν επαρκεί	Ελέγξτε την λειτουργία της πιπέτας.

18. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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).
5. [Van Grunsven WM](#), [van Heerde EC](#), [de Haard HJ](#), [Spaan WJ](#), [Middeldorp JM](#): Gene mapping and expression of two immunodominant Epstein-Barr virus capsid proteins. [J Virol](#). 1993 Jul;67(7):3908-16.



DIESSE Diagnostica Senese
S.p.A.
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (SIENA)
Italy





INSTRUCCIONES DE USO

ENZY-WELL Epstein-Barr VCA IgM

Para la determinación semicuantitativa de anticuerpos IgM anti-antígeno de la capsida viral del Epstein-Barr virus

Sólo para el uso diagnóstico *in vitro*

1. INDICACIONES

Método inmunoenzimático para la determinación semicuantitativa de anticuerpos IgM anti-antígeno de la capsida viral del Epstein-Barr virus 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 nasofaringeo y a síndromes linfático-proliferativos en pacientes inmunodeprimidos. El virus está extendido por todo el mundo donde el 80-90% de la población es seropositiva.

El diagnóstico serológico de IM se realiza tradicionalmente mediante la detección de anticuerpos heterófilos en suero mediante la aglutinación de eritrocitos de caballo, que se desarrollan durante el curso de la enfermedad. Sin embargo estos anticuerpos no siempre están presentes en sujetos afectados por IM, en particular en pacientes menores de 14 años, aunque también pueden persistir después de la infección durante más de un año por lo que la determinación de anticuerpos heterófilos puede a veces conducir a un diagnóstico erróneo.

Por dicho motivo es importante la búsqueda de anticuerpos dirigidos contra antígenos virales. En particular, se apunta como más útil la búsqueda de anticuerpos dirigidos contra 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 posteriormente. Por eso la presencia de IgM anti-VCA en ausencia de IgG anti-EBNA indica que hay una infección en curso, mientras que la presencia de IgG anti-VCA e anti-EBNA es indicativo de una infección pasada.

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 IgM 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 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, ictericas, 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

(PF93054-C)

Contenido: 1 placa de 96 pocillos sensibilizados con antígeno antígeno de la cápsida viral sintético.

Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (EM 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

(PF93571)

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

CAL CALIBRADOR 3x1.6 mL

(PF91871 – PF30077 – PF92072)

Contenido: Suero humano diluido de concentración conocida de anticuerpos IgM, en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% y Azida Sódica al 0.09%. Líquido, listo para su uso.

La titulación en unidades arbitrarias, indicado en etiqueta, es 20-80-160 AU/ml. El calibrador 1 con 20 AU/ml corresponde al cut-off.

Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

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

Contenido: Suero humano, libre de anticuerpos IgM anti-antígeno de la capsida viral del Epstein-Barr virus, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y Azida Sódica al 0.09%.

Líquido, listo para su uso.

SAMP DIL 2 DILUYENTE 2 1x 100 mL

(PF93611)

INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES

Contenido: Solución de proteínas en tampón fosfato con Azida Sódica 0.09% con adición de metilnaranja como colorante.

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

SAMP SORBENT 10 SAMPLE SORBENT 10 1x7 mL (PF30253)

INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES

Contenido: Solución de proteínas en tampón fosfato con Azida Sódica 0.09%, metilnaranja como colorante y anticuerpos anti-IgG humanos.

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
CALIBRADORES	8 semanas 2-8°C
CONTROL NEGATIVO	8 semanas 2-8°C
DILUYENTE 2	hasta la fecha de caducidad a 2-8°C
SAMPLE SORBENT 10	hasta la fecha de caducidad a 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 Sample Sorbent 10 por pocillo y 50 µl de muestra diluida (es preferible realizar el análisis por duplicado).
Distribuir 100 µl de control negativo y 100 µl de cada calibrador por pocillo.
El requisito mínimo indispensable es de 1 control negativo, y 1 de cada nivel de calibración.
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 ENZY-WELL EPSTEIN-BARR VCA IgM

- PASO 1 Poner 50 µL de Sample Sorbent 10 y 50 µL de suero diluido. Echar 100 µL de control negativo y de cada calibrador 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 TEST

Restar el valor del blanco (<0.150) a todas las otras lecturas.

Control negativo: La relación entre la D.O. del control negativo y la D.O. del cut-off (Calibrador 1) debe ser ≤ 0.6 .

Control positivo (Calibrador 3): la D.O. debe ser ≥ 1.0

Control cut-off (Calibrador 1): la D.O. debe ser ≥ 0.2 .

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 319554

Fax: 0039 0577 366605

email: scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

TEST CUALITATIVO

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.

TEST SEMICUANTITATIVO

Poner en el gráfico las D.O. de los calibradores, restando la D.O. del blanco, en función del título (AU/ml) de cada un calibrador. Obtener el título correspondiente de la muestra examinada por interpolación.

Hay que hacer una curva estándar por cada ciclo.

La muestra se considera:

POSITIVA: cuando el resultado es > 24

DUDOSA: para todos los valores de entre 16 y 24

NEGATIVA: cuando el resultado es < 16

Si el resultado es dudoso, repetir el test. Si el resultado continúa siendo dudoso, recoger una nueva muestra de sangre después de más o menos 2 semanas.

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.

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.

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.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

5 muestras (2 Negativos, 1 de Cut-Off y 2 Positivos) fueron analizadas a las cuales se añadieron los interferentes siguientes:

Factor reumatoide (44-220 IU/ml)

Bilirrubina (4.5-45 mg/dl)

Triglicéridos (10-250 mg/dl)
Hemoglobina (5-30 mg/ml)

La presencia en el suero de las sustancias interferentes antes mencionadas no afecta el resultado del test.

14. REACCIONES CRUZADAS

59 muestras, positivas en Toxoplasma, Varicella, Cytomegalovirus, Herpes simplex, Rubella y ANA fueron testadas.

No se detectaron reacciones cruzadas significativas.

15. ESTUDIOS DE COMPARACIÓN

En una prueba, se analizaron 485 muestras con el kit Diesse y con otro kit comercial.

A continuación se muestran los datos de la prueba:

		Referencia		
		+	-	Total
Diesse	+	69	3	72
	-	1	412	413
	Total	70	415	485

Percent Positive Agreement (~Sensibilidad de Diagnóstico):

98.6% CI_{95%}: 92.3 – 99.7

Percent Negative Agreement: (~Especificidad de Diagnóstico):

99.3% CI_{95%}: 97.9.-99.7

16. PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD

Muestra	INTRA-ENSAYO		ENTRE ENSAYOS		ENTRE LOTES	
	Media (Index)	CV%	Media (Index)	CV%	Media (Index)	CV%
1	0.4	12.5	0.4	12.5	0.4	-
2	0.5	14.0	0.5	14.0	0.4	15.0
3	0.3	-	0.3	0.0	0.3	-
4	0.9	7.8	0.9	12.2	0.9	6.7
5	0.9	3.3	0.9	14.4	0.9	11.1
6	1.3	6.9	1.2	7.5	1.2	-
7	1.9	7.4	1.9	8.4	1.8	3.3
8	2.3	6.1	2.7	9.3	2.5	6.0
9	3.3	3.9	3.5	8.3	3.4	4.4
10	2.3	5.2	2.5	10.8	2.3	2.6

17. 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.

18. 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).

5. Van Grunsven WM, van Heerde EC, de Haard HJ, Spaan WJ, Middeldorp JM: Gene mapping and expression of two immunodominant Epstein-Barr virus capsid proteins. J Virol. 1993 Jul;67(7):3908-16.



DIESSE Diagnostica Senese
S.p.A.
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (SIENA)
Italy





INSTRUCTIONS POUR L'UTILISATION

ENZY-WELL Epstein-Barr VCA IgM

Pour la détermination semi-quantitative des anticorps IgM anti-antigènes de la capside du virus d'Epstein-Barr

Uniquement pour diagnostic *in vitro*.

1. UTILISATION

Méthode immunoenzymatique pour la détermination semi-quantitative des anticorps de classe IgM anti-antigènes de la capside du virus d'Epstein-Barr dans le sérum humain.

2. INTRODUCTION

Le virus d'Epstein Barr (EBV) fait parti du groupe Herpès viridae. La mononucléose est la situation clinique la plus fréquente. L'EBV est aussi associé au lymphome de Burkitt, au cancer du rhinopharynx et à certains syndromes lymphoprolifératifs B, chez le sujet immunodéprimé.

Les anticorps anti-EBV sont retrouvés dans tous les groupes de la population. A l'âge adulte, 80 à 90 % de la population possède des anticorps dirigés contre EBV.

Le diagnostic sérologique de la MNI peut être réalisé à l'aide de deux types de réactions complémentaires : la recherche des anticorps hétérophiles, en pratiquant la réaction de Paul Bunell et Davidsohn (PBD) ou une des variantes sur lames. Toutefois, ces anticorps ne sont pas toujours présents dans les sujets avec MNI, particulièrement s'il a moins de 14 ans et en outre, ils peuvent rester dans le sérum plus d'un après l'infection. Le seule recherche des anticorps hétérophiles peut porter à une diagnostic erronée.

Pour cette raison la recherche des anticorps spécifiques anti-EBV est importante. En particulier, la recherche des anticorps dirigés contre l'antigène du capsid viral (VCA) et l'antigène nucléaire (EBNA) peut être très utile.

Pendant la MNI, les anticorps IgG et IgM anti-VCA apparaissent précocement, pendant que les IgG anti-EBNA se développent plus tardivement. Donc la présence des IgM anti-VCA en absence des IgG anti-EBNA indique une infection en cours, pendant que la présence des IgG anti-VCA et anti-EBNA indique le diagnostic d'une infection précédente.

3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le test se base sur le principe ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). L'antigène se lie à la phase solide.

En le faisant incubé avec du sérum humain dilué, les immunoglobulines spécifiques se lient à l'antigène. Après lavage pour éliminer les protéines qui n'ont pas réagi, on effectue l'incubation avec le conjugué constitué d'anticorps monoclonaux anti-IgM humaines conjugués avec du peroxyde de raifort.

Le conjugué non lié est éliminé et le substrat de la peroxydase est ajouté.

La couleur bleue qui se développe est proportionnelle à la concentration des anticorps spécifiques présents dans le sérum en examen.

Lorsque la réaction enzymatique est interrompue par ajout d'une solution d'acide sulfurique, la coloration vire au jaune. La couleur, proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans le sérum, peut être lue dans un lecteur de microplaques.

4. PRÉCAUTIONS

UNIQUEMENT POUR DIAGNOSTIC *IN VITRO*.

Ce coffret contient des matériaux d'origine humaine qui ont été contrôlés et trouvés négatifs, tant pour la recherche de HBsAg que pour la recherche des anticorps anti-VIH-1/VIH-2 et anti-VHC. Étant donné qu'aucun test diagnostic ne peut offrir une garantie absolue quant à l'absence d'agents infectieux, tout matériau d'origine humaine doit être considéré comme étant potentiellement infecté. Tous les réactifs et échantillons doivent être maniés conformément aux normes de sécurité normalement adoptées par les laboratoires.

Mise au rebut des résidus : les échantillons de sérum et les réactifs utilisés doivent être traités comme des résidus infectés. Ils doivent donc être éliminés conformément aux réglementations légales en vigueur.

Avertissements pour la sécurité personnelle

17. Ne pas pipeter avec la bouche.
18. Utiliser des gants à jeter et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et durant l'essai.
19. Se laver soigneusement les mains après avoir terminé le test.
20. En ce qui concerne les caractéristiques de sécurité des réactifs contenus dans le coffret, se référer aux Fiches de Données de Sécurité (disponibles sur demande).
21. Tout matériel non jetable doit être stérilisé après son utilisation, de préférence en autoclave à 121 °C pendant 1 h. Tous les dispositifs à usage unique doivent être éliminés conformément à la réglementation en vigueur.
22. L'acide chlorhydrique 2M utilisé pour laver la verrerie est corrosif; ces substances doivent être utilisées avec prudence. En cas de contact avec la peau ou les yeux, laver abondamment à l'eau.
23. Les acides neutralisés et les déchets liquides doivent être décontaminés avec un volume suffisant de solution d'hypochlorite de sodium pour que la concentration finale soit de 1 % minimum. Une exposition à l'hypochlorite de sodium à 1 % pendant 30 minutes devrait suffire pour garantir une décontamination efficace.
24. En cas de renversement accidentel de matériaux potentiellement infectés, essuyer immédiatement avec du papier absorbant et décontaminer la zone contaminée avec, par exemple, de l'hypochlorite de sodium (1 %), avant de continuer le travail. En présence d'un acide, veiller à bien essuyer le plan de travail avant d'utiliser de l'hypochlorite de sodium. Tout matériel (notamment les gants) utilisé pour décontaminer les zones salies par d'éventuels renversements accidentels, doit être considéré comme potentiellement infecté et éliminé. Ne pas mettre en

autoclave de matériaux contenant de l'hypochlorite de sodium.

Précautions analytiques

37. La D.O. du Cut-Off, des contrôles et des échantillons peut varier légèrement d'une plaque à l'autre. Par conséquent, si l'on utilise durant la même session des barrettes provenant de différentes plaques, même si elles appartiennent au même lot, il faut répéter la détermination du Cut-Off.
38. Laisser les réactifs revenir à la température ambiante (18-30°C) avant leur utilisation. Aussitôt après leur utilisation, conserver les réactifs à la température de conservation recommandée. **Il est important de disposer d'une thermostatisation correcte pour l'incubation des barrettes. Vérifier que le thermostat ne descend pas en-dessous de 35°C et ne dépasse pas 39°C.**
39. Ouvrir le sachet contenant les barrettes après au moins une demi-heure à température ambiante.
40. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption. Éviter toute contamination microbienne des réactifs car cela réduit la validité du produit et peut donner des résultats erronés.
41. Ne pas changer la Procédure, ni remplacer les réactifs par des produits d'autres fabricants ou d'autres lots, sauf s'il est spécifiquement indiqué que le réactif est interchangeable d'un lot à l'autre. Ne pas réduire les temps d'incubation recommandés.
42. Toute verrerie utilisée pour le test doit être lavée soigneusement avec de l'acide chlorhydrique 2M et rincée à l'eau distillée ou déionisée.
43. N'exposer les réactifs ni à une forte lumière, ni aux vapeurs d'hypochlorure pendant leur conservation ou pendant les phases d'incubation.
44. Éviter le dessèchement des puits pendant le test.
45. Éviter l'utilisation de congélateurs auto-dégivrants pour conserver les échantillons.
46. Éviter la contamination croisée entre les réactifs. Il est important d'utiliser des pipettes "dédiées" pour l'utilisation avec le substrat et avec le conjugué.
47. Éviter de toucher le bord du puits avec le conjugué.
48. Ne pas souffler sur les microplaques.
49. Les dosages immunoenzymatiques peuvent parfois présenter un effet particulier sur le bord ("effet de bord") ; on peut minimiser cet effet en augmentant l'humidité durant les phases d'incubation. Les plaques doivent être recouvertes de leurs couvercles et incubées à 37°C ou au bain-marie, en utilisant un support pour les plaques, ou dans un incubateur. Sinon, les plaques peuvent être incubées dans un analyseur adéquat. Pour plus de détails, consulter le manuel d'utilisation de l'instrument. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO₂.
50. Avant de lire la microplaque, veiller à ce que le fond de la microplaque soit propre et sec et qu'il n'y ait aucune bulle d'air à la surface du liquide.
51. Les échantillons fortement hémolysés, lipémiques, ictériques, de sérum non complètement coagulé ou les échantillons présentant une contamination microbienne peuvent causer des résultats erronés.
52. Éviter la contamination des puits avec la poudre des gants jetables.
53. L'utilisation du kit avec des instruments automatiques doit être validée par l'utilisateur.

54. Lire le Manuel d'Utilisation des instruments utilisés, en particulier les chapitres concernant :
 - L'installation et les précautions spécifiques.
 - Le principe opérationnel, les instructions, les précautions et les risques d'utilisation.
 - Les spécifications du fabricant et les performances de l'instrument.
 - La maintenance et le support technique.

5. COMPOSITION DU COFFRET ET PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Les réactifs suffisent pour 96 déterminations.

Laisser les réactifs revenir à la température ambiante avant l'utilisation.

MT PLATE MICROPLAQUE 12x8 (PF 93054-C)

Contenu : 1 plaque de 96 puits sensibilisés avec de l'antigène synthétique de la capsid du virus.

Utilisation : Ouvrir l'enveloppe de la plaque du côté opposé au code (EM suivi du numéro de lot) qui est utilisé à des fins d'identification ; prendre le support et les barrettes nécessaires. Ranger les barrettes non utilisées dans le sachet en polyéthylène avec le gel de silice ; faire sortir l'air et fermer en appuyant sur la fermeture.

CONJ CONJUGUÉ 1x16 mL (PF93571)

Contenu : anticorps monoclonaux anti-IgM humaines marqués à la peroxydase, dans un tampon phosphate contenant 0.05% de phénol et 0.02% de Bronidox. Liquide prêt à l'usage.

CAL CALIBRATEUR 3x1.6 mL (PF91871 – PF30077 – PF92072)

Contenu : Sérum humain à concentration connue d'anticorps IgM, dilué dans un tampon phosphate 0.01 mol/l à 1% de BSA et 0.09% d'azoture de sodium.

Liquide prêt à l'usage.

Le titre, reporté sur l'étiquette en unités arbitraires, est 20-80-160 AU/ml. Le calibrateur 1 contenant 20 AU/ml correspond au contrôle seuil.

Couleur : la couleur des sérums de contrôle dépend de la concentration en anticorps.

CONTROL IgG - CONTRÔLE NÉGATIF IgG 1x1.6 mL (PF93910)

LOTS INTERCHANGEABLES

Contenu : Sérum humain, ne contenant pas d'anticorps IgM anti-antigènes de la capsid du virus d'Epstein-Barr, dilué dans un tampon phosphate 0.01 mol/l contenant 1% de BSA et 0.09% d'azoture de sodium. Liquide prêt à l'usage.

SAMP DIL 2 DILUANT 2 1x100 mL (PF 93611)

LOTS INTERCHANGEABLES

Contenu : Solution protéique dans un tampon phosphate contenant 0.09% d'azoture de sodium et un colorant (orange de méthyle).

Utilisation : A utiliser pour la dilution des échantillons. Liquide prêt à l'usage.

SAMP SORBENT 10 SAMPLE SORBENT 10 1x7 mL
(PF30253)

LOTS INTERCHANGEABLES

Contenu : Solution protéique dans un tampon phosphate avec 0.09 % d'azoture de sodium, un colorant (orange de méthyle) et des anticorps anti-IgG humaines.

Utilisation : A utiliser pour la dilution des échantillons (dans le puits). Liquide prêt à l'usage.

WASH BUF 10x TAMPON DE LAVAGE 10x 1x100 mL
(PF93603)

LOTS INTERCHANGEABLES

Contenu : Solution saline tamponnée (PBS) concentrée 10 fois contenant 0.5% de Brij.

Préparation : Diluer le volume nécessaire 1:10 avec de l'eau distillée ou déionisée pour obtenir le tampon de lavage prêt à l'emploi. Si des cristaux sont présents, les dissoudre à 37°C avant la dilution.

SUBS TMB SUBSTRAT 1x12 mL
(PF 93619)

LOTS INTERCHANGEABLES

Contenu : Tétraméthylbenzidine (0.26 mg/ml) et H₂O₂ (0.01%) stabilisés dans un tampon citrate 0.05 mol/l (pH 3.8). Liquide prêt à l'usage.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUTION D'ARRÊT 1x16 mL
(PF 93602)

LOTS INTERCHANGEABLES

Contenu : Solution de H₂SO₄ 0.3 mol/l. Liquide prêt à l'usage.

FEUILLES ADHÉSIVES (2)
SACHET EN POLYETHYLÈNE (1)

AUTRE MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Incubateur à 37-40°C
- Lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 ou 450/620 nm, avec une linéarité jusqu'à OD ≥ 2.000)
- Laveur de microplaques (recommandé) capable de fournir des volumes de 225-375 µl
- Eau distillée ou déionisée
- Verrerie normale de laboratoire : cylindres, éprouvettes, etc.
- Micropipettes capables de prélever 10,100,1000 µl de solution
- Gants à usage unique
- Chronomètre
- Solution d'hypochlorure de sodium (5 %)
- Récipients pour les matériaux potentiellement infectés
- Papier absorbant

6. MODALITÉS DE CONSERVATION ET STABILITÉ DES RÉACTIFS

Les réactifs doivent être conservés à 2-8°C.

La date de péremption est imprimée sur chaque composant et sur l'étiquette apposée sur l'emballage.

Les réactifs ont une stabilité limitée après ouverture et/ou préparation:

MICROPLAQUE	8 semaines à 2-8°C, sachet en polythène
CONJUGUE	8 semaines à 2-8°C
CALIBRATEURS	8 semaines à 2-8°C
CONTRÔLE NÉGATIF	8 semaines à 2-8°C
DILUANT 2	jusqu'à péremption à 2-8°C
SAMPLE SORBENT 10	jusqu'à péremption à 2-8°C
SUBSTRAT	jusqu'à péremption à 2-8°C; 1 semaine à 15-30°C; dans l'obscurité
TAMPON DE LAVAGE	2 semaines à 2-8°C; 5 jours à 15-30°C
SOLUTION D'ARRÊT	jusqu'à péremption à 2-8°C

7. TYPE D'ÉCHANTILLON ET CONSERVATION

L'échantillon est représenté par le sérum obtenu par du sang prélevé par prise de sang normale et manipulé comme recommandé dans les procédures standard de laboratoire.

Les conséquences de l'utilisation d'autres liquides biologiques ne sont pas connues.

Le sérum frais peut être conservé pendant 4 jours entre 2 et 8 °C ; pour des périodes de conservation plus longues, congeler à - 20°C.

L'échantillon peut subir jusqu'à un maximum de 3 décongelations.

Éviter l'utilisation de congélateurs auto-dégivrants pour conserver les échantillons. Après décongelation, agiter avec soin avant le dosage.

La non-activation à la chaleur peut provoquer des résultats erronés.

La qualité de l'échantillon peut être sérieusement influencée par la contamination microbienne qui peut porter à des résultats erronés.

8. PROCÉDURE

PRÉPARATION

Avant le début du test, amener tous les réactifs à température ambiante (18-30°C).

- Préparer le nombre nécessaire de barrettes.
- Préparer le tampon de lavage en diluant le tampon de lavage 10x (100 ml + 900 ml H₂O).
- Diluer les échantillons 1:26 en distribuant 40 µl de sérum dans 1 ml de diluant.

EXÉCUTION DU TEST

15. Distribution des échantillons :

Distribuer 50 µl de Sample Sorbent 10 par puits et 50 µl d'échantillon dilué (il est préférable d'effectuer l'analyse en double).

Distribuer 100 µl de contrôle négatif et 100 µl de chaque calibrateur par puits.

Le strict minimum est de 1 contrôle négatif et 1 de chaque niveau de calibrage.

Laisser un puits de la barrette pour le blanc (100 µl de substrat).

16. Incubation :

Incuber la plaque recouverte d'une feuille adhésive à 37°C pendant 45 minutes.

17. Lavage :

Retirer la feuille adhésive, aspirer le contenu de tous les puits et laver 4 fois en remplissant chaque puits avec 300 µl de solution de lavage. Attendre 30 secondes avant chaque lavage.

18. Distribution du conjugué :
Distribuer 100 µl de conjugué à chaque puits de la plaque.
19. Incubation du conjugué :
Incuber la plaque recouverte d'une feuille adhésive à 37°C pendant 45 minutes.
20. Lavage :
Retirer la feuille adhésive, aspirer le contenu de tous les puits et laver 4 fois en remplissant chaque puits avec 300 µl de solution de lavage. Attendre 30 secondes avant chaque lavage.
21. Distribution du substrat :
Distribuer 100 µl de substrat à chaque puits de la plaque.
22. Incubation du substrat :
Incuber la plaque à température ambiante pendant 15 minutes.
23. Arrêt de la réaction :
Distribuer 100 µl de solution d'arrêt en suivant l'ordre d'ajout indiqué au point 4.
24. Lecture :
Lire les D.O. à 450 nm ou 450/620 nm dans un délai de 30 min. Relire à 405 nm s'il y a des D.O. supérieures à 2.000.

9. SCHÉMA DE L'ESSAI POUR ENZY-WELL EPSTEIN-BARR VCA IgM

- | | |
|---------|---|
| PHASE 1 | Mettre 50 µL de Sample Sorbent 10 et 50 µL de sérum dilué. Mettre 100 µL de contrôle négatif et de calibrateur dans les puits de la barrette. Agiter. |
| | - |
| | Incuber 45 min. à 37°C |
| | - |
| | Laver 4 fois (300 µL) |
| | - |
| PHASE 2 | Mettre 100 µL de conjugué par puits |
| | - |
| | Incuber 45 min. à 37°C |
| | - |
| | Laver 4 fois (300 µL) |
| | - |
| PHASE 3 | Mettre 100 µL de Substrat par puits |
| | - |
| | Incuber 15 min. à t.a. |
| | - |
| PHASE 4 | Ajouter 100 µL de Solution d'Arrêt |
| | - |
| | Lire la D.O. à 450 nm ou 450/620 nm dans un délai de 30 min. |

10. VALIDATION DU TEST

Retirer la valeur du blanc (< 0.150) de toutes les autres lectures.

Contrôle négatif : le rapport entre la D.O. du contrôle négatif et la D.O. du cut-off (Calibrateur 1) doit être ≤ 0.6

Contrôle positif (Calibrateur 3) : doit avoir une D.O. ≥ 1.0

Contrôle cut-off (Calibrateur 1) : la D.O. doit être ≥ 0.2.

Si l'un des résultats des sérums de contrôle n'est pas compris dans la plage d'acceptation, répéter le test. Si le problème persiste, contacter le Scientific Support.

Tél. : 0039 0577 319554
Fax : 0039 0577 366605
e-mail : scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

RÉSULTATS QUALITATIFS

Calculer le rapport entre la valeur de la D.O. de l'échantillon et celle du Cut-Off (Indice).

L'échantillon est considéré comme :

POSITIF : quand l'Indice est > 1.2

DOUTEUX : pour toutes les valeurs 0.8-1.2

NÉGATIF : quand l'Indice est < 0.8

En cas de résultat incertain, refaire le test. Si le résultat reste incertain, répéter le prélèvement.

RÉSULTATS SEMI-QUANTITATIFS

Tracer la courbe des D.O. des calibrateurs, soustraites de la D.O. du blanc, selon le titre (AU/ml) de chaque calibrateur.

Obtenir le titre correspondant de l'échantillon examiné par interpolation.

Effectuer une courbe standard pour chaque session.

L'échantillon est considéré comme :

POSITIF : quand le résultat est > 24

DOUTEUX : pour toutes les valeurs comprises entre 16 et 24

NÉGATIF : quand le résultat est < 16

En cas de résultat incertain, refaire le test. Si le résultat reste incertain, répéter le prélèvement après environ 2 semaines.

12. LIMITES DU TEST

Toutes les valeurs obtenues nécessitent une interprétation prudente ne négligeant pas d'autres indicateurs relatifs au même patient.

En effet, les test ne peut être utilisé seul pour un diagnostic clinique et le résultat du test doit être évalué conjointement avec des données provenant de l'anamnèse du patient et/ou d'autres enquêtes diagnostiques.

Une interprétation attentive d'une infection provoquée par l'EBV se base sur les résultats du VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG, EA IgG et EA IgM.

Les caractéristiques de la performance n'ont pas été évaluées dans les sujets atteints du lymphome de Burkitt, le cancer du rhinopharynx ou d'autres lympho-adénopathies associés à l'EBV, à l'exclusion de la mononucléose associée à l'EBV.

13. SPÉCIFICITÉ DE L'ANALYSE

5 échantillons ont été testés (2 négatifs, 1 cut-off et 2 positifs), auxquels les perturbateurs suivants ont été ajoutés :

Facteur rhumatoïde (44-220 IU/ml)

Bilirubine (4.5-45 mg/dl)

Triglycérides (10-250 mg/dl)

Hémoglobine (5-30 mg/ml)

La présence dans le sérum examiné des perturbateurs susmentionnés n'altère pas le résultat du test.

14. RÉACTIONS CROISÉES

59 échantillons positifs aux Toxoplasma, Varicella, Cytomegalovirus, Herpes simplex, Rubella, ANA ont été testés. Aucune réaction croisée significative n'a été relevée.

15. ÉTUDES DE COMPARAISON

Au cours d'un essai, 485 échantillons ont été analysés avec le kit Diesse et avec un autre kit en vente dans le commerce. Les données de l'essai sont schématisées ci-après :

		Référence		
		+	-	Total
Diesse	+	69	3	72
	-	1	412	413
	Total	70	415	485

Percent Positive Agreement (~Sensibilité diagnostique) : 98.6% CI_{95%}: 92.3 – 99.7

Percent Negative Agreement: (~Spécificité diagnostique) : 99.3% CI_{95%}: 97.9.-99.7

16. PRÉCISION ET REPRODUCTIBILITÉ

Échantillon	INTRA-SÉANCE		INTER-SÉANCES		INTER-LOTS	
	Moyenne (Index)	CV %	Moyenne (Index)	CV %	Moyenne (Index)	CV %
1	0.4	12.5	0.4	12.5	0.4	-
2	0.5	14.0	0.5	14.0	0.4	15.0
3	0.3	-	0.3	0.0	0.3	-
4	0.9	7.8	0.9	12.2	0.9	6.7
5	0.9	3.3	0.9	14.4	0.9	11.1
6	1.3	6.9	1.2	7.5	1.2	-
7	1.9	7.4	1.9	8.4	1.8	3.3
8	2.3	6.1	2.7	9.3	2.5	6.0
9	3.3	3.9	3.5	8.3	3.4	4.4
10	2.3	5.2	2.5	10.8	2.3	2.6

17. RÉOLUTION DES PROBLÈMES

PROBLÈME	CAUSES POSSIBLES	MESURES À PRENDRE
Session non valable (tous négatifs)	Absence d'un ou de plusieurs réactifs, ou ajout des réactifs en ordre erroné	Contrôler la procédure. Contrôler si un réactif n'a pas été ajouté. Refaire le test.
	Plaque non réactive	Contrôler le code imprimé sur le sachet de la plaque (lire le mode d'emploi).
		Contrôler s'il y a de l'humidité sur la plaque inutilisée. (Le gel de silice doit présenter une couleur jaune pâle). Refaire le test.
Session non valable (tous positifs)	Contamination du substrat	Prélever une nouvelle quantité de substrat.

Précision insuffisante	Lavage insuffisant	S'assurer que le laveur fonctionne correctement
	Aspiration insuffisante des puits	S'assurer que le laveur fonctionne correctement
	Erreur de pipetage	S'assurer que la pipette fonctionne correctement
	Ajout des réactifs trop lent	Éviter le dessèchement de la plaque après la phase de lavage. Ajouter immédiatement les réactifs.
	Présence de bulles d'air	Éviter la formation de bulles d'air pendant le pipetage.
	Parcours optique pas propre	Contrôler la source lumineuse et la présence d'impuretés. Essuyer le fond de la plaque avec un mouchoir en papier.
Développement insuffisant de la couleur	Temps ou température d'incubation non correct	Vérifier le contrôle de la température et du temps d'incubation
	Substrat ajouté en volume inadéquat	Contrôler le fonctionnement de la pipette.

18. BIBLIOGRAPHIE

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).
5. [Van Grunsven WM](#), [van Heerde EC](#), [de Haard HJ](#), [Spaan WJ](#), [Middeldorp JM](#): Gene mapping and expression of two immunodominant Epstein-Barr virus capsid proteins. [J Virol](#). 1993 Jul;67(7):3908-16.

DIESSE Diagnostica Senese
S.p.A.
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (SIENA)
Italie





INSTRUCCIONES DE USO

ENZY-WELL Epstein-Barr VCA IgM

Para a determinação semiquantitativa dos anticorpos IgM anti-antígeno capsídeo do vírus de Epstein-Barr

Somente para uso diagnóstico in vitro

1. UTILIZAÇÃO

Método imunoenzimático para a determinação semiquantitativa dos anticorpos IgM anti-antígeno capsídeo do vírus de Epstein-Barr no soro humano.

2. INTRODUÇÃO

O vírus de Epstein-Barr (EBV) é vírus herpético que causa a mononucleose infecciosa (MI). Este vírus é associado ao linfoma de Burkitt, ao carcinoma nasofaríngeo e a síndromes linfoproliferativas nos imunodeficientes. O vírus se encontra em todo mundo, e 80-90% da população é soropositivo.

A diagnose laboratorial de MI é geralmente feita por meio da detecção, no soro, de anticorpos heterofilos aglutinantes os glóbulos vermelhos de cavalo. Porém, estes anticorpos, que aparecem durante a doença, podem não ser presentes em pacientes com MI, em particular nos mais jovens de 14 anos, e podem permanecer por mais de um ano depois da infecção. Portanto, a detecção exclusiva de anticorpos heterofilos pode gerar uma diagnose errada.

Por este motivo é importante detectar anticorpos direcionados contra os antígenos virais. É de particular utilidade a detecção de anticorpos contra o complexo antigénico nomeado "Viral Capsid Antigen" (VCA) e o antígeno nucléico (EBNA).

Durante a MI, os anticorpos IgM e IgG contra VCA aparecem cedo, enquanto os anticorpos IgG contra EBNA aparecem mais tarde. Portanto, a presença de IgM contra VCA em ausência de IgG contra EBNA é indicativa de infecção em curso, enquanto a presença de IgG contra VCA e de IgG contra EBNA sugere para uma diagnose de infecção progressiva.

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-IgM 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

(PF93054-C)

Conteúdo: 1 placa de 96 poços sensibilizados com antígeno capsídeo do vírus sintético

Utilização: Abrir a embalagem da placa a partir do lado oposto ao código (EM 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

(PF93571)

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

CAL CALIBRADOR 3x1.6 mL

(PF91871 – PF30077 – PF92072)

Conteúdo: Soro humano diluído com uma concentração conhecida de anticorpos IgM, em tampão de fosfato 0.01 mol/L com BSA 1% e Azida de Sódio 0.09%. Líquido, pronto a usar. A titulação em unidades arbitrárias, indicada no rotolo, é de 20, 80, 160 AU/ml. O calibrador que contém 20 AU/ml corresponde ao directo.

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

CONTROL IgG - IgG CONTROLO NEGATIVO 1x1.6 mL

(PF93910)

Conteúdo: Soro humano, isento de anticorpos IgM anti-antígeno capsídeo do vírus de Epstein-Barr diluído em tampão de fosfato 0.01 mol/L contendo BSA 1% e Azida de Sódio 0.09%. Líquido, pronto a usar.

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 1x 100 mL (PF93611)**INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Solução proteica em tampão fosfatado com Azida de Sódio a 0.09% e metil-orange como corante.

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

SAMP SORBENT 10

SAMPLE SORBENT 10 1x7 mL

(PF30253)

INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES

Conteúdo: Solução proteica em tampão de fosfato com Azida de Sódio 0.09%, corante (metil-orange) e anticorpos anti-IgG humanas.

Uso: 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
CALIBRADORES	8 semanas a 2-8°C
CONTROLO NEGATIVO	8 semanas a 2-8°C
DILUENTE 2	até ao prazo de validade a 2-8°C
SAMPLE SORBENT 10	até ao prazo de validade 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 Sample Sorbent 10 por poço e 50 µl de amostra diluída (é preferível efetuar uma análise dupla). Distribuir 100 µl de controlo negativo e 100 µl de cada calibrador por poço.
O requisito mínimo indispensável é 1 controlo negativo e 1 de cada nível de calibração.
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 ENZY-WELL EPSTEIN-BARR VCA IgM

- PASSO 1 Distribuir 50 µL de Sample Sorbent 10 e 50 µL de soro diluído. Distribuir 100 µL de controlo negativo e de cada calibrador 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 (< 0.150) de todas as outras leituras.

Controlo negativo: A relação entre a D.O. do controlo negativo e a D.O. do cut-off (Calibrador 1) deve ser ≤ 0.6 .

Controlo positivo (Calibrador 3): a D.O. deve ser ≥ 1.0

Controlo cut-off (Calibrador 1): a D.O. deve ser ≥ 0.2 .

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 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

TEST QUALITATIVO

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

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.

TEST SEMIQUANTITATIVO

Transformar em gráfico as OD dos calibradores, subtraídas da OD do branco, em função do título (AU/ml) de cada calibrador. Obter o título correspondente da amostra em exame por interpolação.

Deve ser executada uma curva padrão para cada sessão.

A amostra é considerada:

POSITIVA: quando o resultado for > 24

INCERTA: para todos os valores incluídos entre 16 e 24

NEGATIVA: quando o resultado for < 16

Repetir o teste em caso de resultado incerto. Se o resultado continua incerto, repetir a colheita ao fim de cerca de 2 semanas

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.

Uma interpretação exacta de uma infecção EBV deve basear-se nos resultados de VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG, EA IgG e EA IgM.

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.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas 5 amostras (2 Negativos, 1 Cut-Off e 2 Positivos) às quais foram adicionados os seguintes interferentes:

Fator Reumatoide (44-220 IU/ml)

Bilirrubina (4.5-45 mg/dl)

Triglicéridos (10-250 mg/dl)

Hemoglobina (5-30 mg/ml)

A presença, no soro em análise, das substâncias interferentes acima referidas não altera o resultado do teste.

14. REAÇÕES CRUZADAS

59 amostras, positivas em Toxoplasma, Varicella, Cytomegalovirus, Herpes simplex, Rubella e ANA foram testadas.

Não foram detectadas reações cruzadas significativas.

15. ESTUDOS DE COMPARAÇÃO

Numa experimentação foram analisadas 485 amostras com o kit Diesse e com um outro kit do mercado.

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

		Referência		
		+	-	Total
Diesse	+	69	3	72
	-	1	412	413
	Total	70	415	485

Percent Positive Agreement (~Sensibilidade Diagnóstica):

98.6% CI_{95%}: 92.3 – 99.7

Percent Negative Agreement: (~Especificidade Diagnóstica):

99.3% CI_{95%}: 97.9.-99.7

16. PRECISÃO E REPETIBILIDADE

Amostra	No Ensaio		Entre Ensaios		Entre Lotes	
	Média (Index)	CV %	Média (Index)	CV%	Média (Index)	CV%
1	0.4	12.5	0.4	12.5	0.4	-
2	0.5	14.0	0.5	14.0	0.4	15.0
3	0.3	-	0.3	0.0	0.3	-
4	0.9	7.8	0.9	12.2	0.9	6.7
5	0.9	3.3	0.9	14.4	0.9	11.1
6	1.3	6.9	1.2	7.5	1.2	-
7	1.9	7.4	1.9	8.4	1.8	3.3
8	2.3	6.1	2.7	9.3	2.5	6.0
9	3.3	3.9	3.5	8.3	3.4	4.4
10	2.3	5.2	2.5	10.8	2.3	2.6

17. 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

18. 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).
5. Van Grunsven WM, van Heerde EC, de Haard HJ, Spaan WJ, Middeldorp JM: Gene mapping and expression of two immunodominant Epstein-Barr virus capsid proteins. J Virol. 1993 Jul;67(7):3908-16.



DIESSE Diagnostica Senese
S.p.A.
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (SIENA)
Italy



	EN Use By ES Fecha de caducidad IT Utilizzare entro	FR Utiliser jusqu' 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