



ENZYWELL

EPSTEIN BARR VCA IgG

REF 91055 (96 tests)

Prodotto da/Manufactured by/ Hersteller:
Κατασκευάζεται από/ Fabricado por/ Fabriqué par:
DIESSE Diagnostica Senese
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy



INDICE / INDEX / INHALT/ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / INDICE / SOMMAIRE /CONTEÚDO

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / VERWENDUNGSZWECK/ ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ / INDICACIONES DE USO/ UTILISATION/UTILIZAÇÃO PRETENDIDA
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / PHYSIOLOGIE/ ΕΙΣΑΓΩΓΗ / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / INTERET CLINIQUE / SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / TESTPRINZIP/ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCIPE/ PRINCÍPIOS DO TESTE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / INHALT DES KITS UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN / ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΡΙΩΝ / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS / CONTEÚDA DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE /
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN / ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΡΙΩΝ/ CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS / ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN/ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUTIONS D'UTILISATION / PRECAUÇÕES
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / ART UND LAGERUNG DER PROBEN / ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION / TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / TESTDURCHFÜHRUNG / ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / PROCEDIMIENTO DEL TEST / PROCEDURE / PROCEDIMENTO DE TESTE /
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / TESTSCHEMA /ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ/ ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / SCHEMA D'ANALYSE/ ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE /
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / TESTVALIDIERUNG / ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ / VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDATION DU TEST / VALIDAÇÃO DO TESTE /
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETATION DER ERGEBNISSE / ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETATION DU TEST / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / GRENZEN DES VERFAHRENS / ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITES DU TEST/ LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO /
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ANALYTISCHE SPEZIFITÄT /ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ/ ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / SPECIFICITE ANALYTIQUE / ESPECIFICIDADE ANALÍTICA /
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / DIAGNOSTISCHE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT /ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES / ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO
15. PRECISIONE / PRECISION / PRÄZISION / ΑΚΡΙΒΕΙΑ / PRECISIÓN / PRECISION / PRECISÃO
16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / “TROUBLE SHOOTING” / “TROUBLE SHOOTING” (PROBLEMLÖSUNGEN) /ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ /GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUTION DES PROBLEMES / RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / LITERATUR / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHIE / REFERÊNCIAS



ISTRUZIONI PER L'USO

ENZYWELL EPSTEIN BARR VCA IgG

REF 91055

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

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

2. INTRODUZIONE

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

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

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

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

3. PRINCIPIO DEL METODO

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

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

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

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.
- **Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE MICROPIASTRA. 12x8 pozzetti sensibilizzati con antigeni dell'Epstein-Barr Virus.

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

CONJ CONIUGATO 1 x 16 mL

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

CAL CALIBRATORI 3 x 1.6 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi IgG, in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione. Il titolo in unità arbitrarie, riportato in etichetta, è 20-80-160 AU/ml. Il calibratore 1 con 20 UA/ml corrisponde al cut-off.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

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

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

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

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

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

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

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

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

SORBENT G DILUENTE EBV (PF91083) 1 x 7 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Da porre nei pozzetti per diluire i campioni.

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

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

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

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

Soluzione di H₂SO₄ 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

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

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

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

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

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

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

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

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

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**
Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO₂.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.

12. L'uso del kit con strumento automatici deve essere validato dall'utilizzatore.
13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
- installazione e requisiti particolari
 - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
 - specifiche del produttore e performance dello strumento
 - manutenzione e assistenza tecnica

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

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

Campioni fortemente lipemici, itterici, emolizzati o inquinati non dovrebbero essere utilizzati.

Il test non è applicabile al plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

Diluire i campioni 1:26 dispensando 40 µL di siero in 1 mL di diluente. Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato. Distribuire 50 µL di Sorbent G e 50 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato). In uno strip porre il controllo negativo (NON DILUITO) ed i calibratori (NON DILUITI) (100 µL per pozzetto senza il Sorbent G), preferibilmente in duplicato. Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 45 min. a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30 secondi ciascuno (300 L) si aggiungono 100 µL del coniugato per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Si lava di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi si distribuisce il Substrato, 100 µL/pozzetto. Dopo 15 min. a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la Assorbanza (O.D.) a 450 nm o a 450/620 nm entro 30 min.

9. SCHEMA DEL SAGGIO

Lasciare un pozzetto libero per il bianco.

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

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Togliere il valore del bianco (<0.150) a tutte le altre letture. Il controllo positivo (CALIBRATORE 3) deve avere O.D. >= 1.0. Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere <= 0.6. La D.O. del Cut-off deve essere >= 0.2 a 450 nm e >= 0.16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Risultati qualitativi

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

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

Positivo: quando il rapporto è > 1.2 .

Dubbio: $= \pm 20\%$ del Cut-off.

Negativo: quando il rapporto è < 0.8 .

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

Risultati semiquantitativi

Unità Arbitrarie (AU)

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

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

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Sieri prelevati durante la fase acuta dell'infezione, quando sono presenti solamente anticorpi della classe IgM, potrebbero risultare negativi con questa tecnica.

Il livello delle IgM anti-VCA dovrebbe essere determinato usando il kit VCA IgM. Alternativamente, si analizzerà un secondo campione prelevato 8-14 giorni più tardi, per verificare un eventuale aumento delle IgG. Il risultato del test deve essere comunque valutato insieme a dati provenienti da altre procedure diagnostiche.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

10 sieri di pazienti negativi al virus di Epstein Barr contenevano anticorpi con virus quali Cytomegalovirus, Herpes Simplex, Varicella Zoster. In nessun caso la presenza di detti anticorpi ha mostrato cross-reattività nel test EBV VCA IgG.

14. SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA

262 campioni sono stati analizzati in parallelo con il kit Diesse e con uno del commercio. I risultati sono riassunti nella tabella che segue:

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	232	0
	-	6	24

Il metodo ENZYWELL risulta avere una sensibilità del 97,5% ed una specificità del 100%.

15. PRECISIONE

Precisione all'interno della seduta eseguita su 3 lotti diversi

<i>Cut-off n=15</i>	<i>Lotto 016</i>	<i>Lotto 018</i>	<i>Lotto 019</i>
<i>D.O.</i>	0.406	0.446	0.552
<i>CV%</i>	10	6	3

Precisione tra sedute e tra lotti

	INDEX				
Campione	Lotto 016	Lotto 018	Lotto 019	Media	CV%
1	0.3	0.5	0.4	0.4	25
2	1.7	1.6	1.9	1.7	9
3	2.2	2.9	2.6	2,6	14

16. GUIDA AI PROBLEMI DI UTILIZZO

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

17. BIBLIOGRAFIA

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).



INSTRUCTIONS FOR USE

ENZYWELL EPSTEIN BARR VCA IgG

REF 91055

(English)

1. INTENDED USE

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

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

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

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

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

3. PRINCIPLE OF THE TEST

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

The partially purified EBV antigen is bound to the solid phase. Following incubation with dilute human serum, the specific immunoglobulins are bound to the antigen.

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

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

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

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 96 determinations.
- **Bring to room temperature before use.**

MT PLATE MICROPLATE 12x8 wells coated with Epstein Barr Virus antigens.

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

CONJ CONJUGATE 1 x 16 mL

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

Preparation: ready for use.

CAL CALIBRATORS 3 x 1.6 mL

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

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

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

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

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

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

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

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

To be used to dilute samples.

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

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

To be placed in the wells to dilute the samples.

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

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619) 1x12 mL Ready for use **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

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

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

H₂SO₄ 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

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

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

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

6. 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 material of human origin.

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

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
 - a) The Wash Buffer contains detergents
 - b) The conjugate contains phenol
 - c) The substrate is acid
 - d) The calibrators/controls contain 0.9% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides.

If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.

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

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature.
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO₂ incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. Use of the kit with automatic instruments must be validated by the user.
13. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:

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

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

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

The test is not applicable to human plasma.

8. TEST PROCEDURE

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

Dilute samples 1:26 distributing 40 µL of serum into 1 mL of diluent. Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture. Dispense 50 µL of Sorbent G and 50 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED Negative Control and Calibrators in a strip (100 µL in each well without the Sorbent), preferably in duplicate.

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

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

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

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

Leave one well empty for the blank

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

10. TEST VALIDATION

Subtract the value of the blank (< 0.150) from all the other readings. The Positive Control (CALIBRATOR 3) must have an OD ≥ 1.0. The ratio between Negative Control and cut-off must be ≤ 0.6. The O.D. of the Cut-off must be ≥ 0.2 at 450 nm and ≥ 0.16 at 450/620 nm.

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

Qualitative results

If the adsorbance of the sample is higher than that of the Cut-off (CALIBRATOR 1), the sample is positive for the presence of specific IgG.

Calculate the ratio (INDEX) between the O.D. value of the sample and that of the Cut-off (CALIBRATOR 1). The sample is considered:

Positive: if the ratio is > 1.2 .

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

Negative: if the ratio is < 0.8 .

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

Semiquantitative results

Arbitrary Units (AU)

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

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

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

A serum sample obtained during the acute phase of infection, when only IgM antibodies are present, may be negative by this procedure.

The VCA IgM level should be determined using the VCA IgM kit. Alternatively, a second serum sample obtained 8-14 days later, should be tested in parallel to determine an increase in the IgG antibody level.

The test result should be used in conjunction with information available from the evaluation of other diagnostic procedures.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

Ten serum samples which were negative for Epstein Barr virus antibodies, which contained Ab against Cytomegalovirus, Herpes Simplex or Varicella Zoster were tested. In no case did the presence of these antibodies show cross-reactivity in the EBV VCA IgG test.

14. SENSITIVITY AND SPECIFICITY

262 samples were tested in parallel with the Diesse kit and with another commercial kit. The results can be summarized as follows:

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	232	0
	-	6	24

The ENZYWELL method shows a sensitivity of 97.5% and a specificity of 100%.

15. PRECISION

“Within run” Precision performed on three different batches

<i>Cut-off n=15</i>	<i>Lot 016</i>	<i>Lot 018</i>	<i>Lot 019</i>
<i>O.D.</i>	0.406	0.446	0.552
<i>CV%</i>	10	6	3

“Between run” and “Between batch” Precision

	INDEX				
Sample	Lot 016	Lot 018	Lot 019	Average	CV%
1	0.3	0.5	0.4	0.4	25
2	1.7	1.6	1.9	1.7	9
3	2.2	2.9	2.6	2,6	14

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

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

17. REFERENCES

1. 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).



GEBRAUCHSANWEISUNG

ENZYWELL EPSTEIN BARR VCA IgG

REF 91055

(Deutsch)

1. VERWENDUNGSZWECK

Enzywell Epstein Barr VCA IgG ist eine immunenzymatische Methode zur semiquantitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen das virale Kapsidantigen (VCA) des Epstein-Barr-Virus in humanem Serum.

2. PHYSIOLOGIE

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein Herpesvirus, der Erreger der Mononukleose. Es wird auch mit dem Burkitt-Lymphom, dem Nasopharynxkarzinom und lymphoproliferativen Syndromen bei immunsupprimierten Patienten in Verbindung gebracht. Das Virus ist auf der ganzen Welt verbreitet. Zwischen 80 und 90 % der Bevölkerung sind seropositiv.

Die Labordiagnose der Mononukleose erfolgt i.d.R. durch den Nachweis heterophiler Antikörper, die sich im Laufe der Infektion im Serum entwickeln und Erythrozyten vom Pferd agglutinieren. An Mononukleose erkrankte Patienten weisen jedoch nicht immer diese Antikörper auf, vor allem wenn es sich um Patienten unter 14 Jahren handelt. Darüber hinaus können diese Antikörper noch nach mehr als einem Jahr nach der Infektion vorhanden sein. Die Bestimmung heterophiler Antikörper alleine kann daher zu einer falschen Diagnose führen. Aus diesem Grund ist es wichtig, das Vorhandensein von Antikörpern gegen Virusantigene zu bestimmen. Der Nachweis von gegen das virale Kapsidantigen und das nukleäre Antigen des Epstein-Barr-Virus (EBNA) gerichteten Antikörpern ist besonders sinnvoll.

Im Verlauf der Mononukleose treten die gegen VCA gerichteten IgM- und IgG-Antikörper früh auf. Die IgG-Antikörper gegen EBNA entwickeln sich dagegen zu einem späteren Zeitpunkt während der Infektion. Das Vorhandensein von IgM-Antikörpern gegen VCA ohne IgG-Antikörper gegen EBNA weist daher auf eine aktuelle Infektion hin, während das Vorhandensein von IgG-Antikörpern gegen VCA und EBNA für eine frühere Infektion spricht.

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der ELISA-Technik (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Das teilweise gereinigte EBV-Antigen ist an eine Festphase gebunden. Die spezifischen Immunglobuline werden bei der Inkubation mit verdünntem Patientenserum an das Antigen gebunden.

Die ungebundenen Proteine, die nicht reagiert haben, werden aus den Wells gewaschen; danach folgt eine Inkubation mit dem Konjugat aus monoklonalen Antikörpern gegen humanes IgG, die mit Peroxidase gekoppelt sind.

Das ungebundene Konjugat wird entfernt und das Peroxidase-Substrat zugegeben.

Die Farbe, die sich entwickelt, ist proportional zur Konzentration von spezifischen Antikörpern, die in der Probe vorhanden sind.

4. KITKOMPONENTEN

- Die Reagenzien sind ausreichend für 96 Bestimmungen.
- **Vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.**

MT PLATE MIKROTITERPLATTE 12x8 Wells, beschichtet mit Epstein-Barr-Virus-Antigenen.

Gebrauch: Die Verpackung an der gegenüberliegenden Seite des Codes (VG plus Lotnummer) öffnen und die nicht benötigten Streifen im beigefügten Plastikbeutel mit dem Silica-Gel lagern; die Luft ausdrücken und gut verschließen.

CONJ KONJUGAT 1 x 16 mL

Inhalt: Monoklonale Antikörper gegen humanes IgG, gekoppelt mit Peroxidase, in Phosphatpuffer mit 0,05 % Phenol und 0,02 % Bronidox.

Rekonstitution: Gebrauchsfertig.

CAL KALIBRATOREN 3 x 1,6 mL

Inhalt: Verdünntes Humanserum mit bekannter Anti-EBV-IgG-Konzentration in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 1 % BSA und 0,09 % Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung. Die Kalibratoren enthalten folgende Konzentrationen von Anti-VCA-IgG-Antikörpern: 20-80-160 AU/ml. Kalibrator 1 (20 AU/ml) entspricht dem Cut-off

Farbe: Die Farbintensität der Kalibratoren ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

CONTROL IgG - IgG NEGATIVKONTROLLE (PF93910) 1 x 1,6 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR VON PANEL EBV REF 91055 VCA IgG, 91056 VCA IgM, 91057 EBNA IgG, 91058 EA IgG, 91059 EA IgM.**

Rif. IO - 09/020 – Inf. Tecn. 91055 – Ed. 09.07.2010

Inhalt: Verdünntes Humanserum in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 1 % BSA und 0,09 % Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1x12 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: 0,26 mg/ml Tetramethylbenzidin und 0,01 % Wasserstoffperoxid, stabilisiert in 0,05 mol/l Zitratpuffer (pH 3,8). Gebrauchsfertig.

SAMP DIL 10 VERDÜNNUNGSMITTEL 10 (PF93621) 1x100 mL Für die Verdünnung von Proben. **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: Proteinlösung (10%) in Phosphatpuffer mit 0,09 % Natriumazid und Methylorange.

WASH BUF 10x WASCHPUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 10fach konzentriert; enthält 0,5 % Brij.

Rekonstitution: Verdünnen Sie die benötigte Menge 1:10 mit destilliertem Wasser, um den gebrauchsfertigen Waschpuffer herzustellen. Falls Kristalle vorhanden sind, sollten sie vor der Verdünnung bei 37 °C gelöst werden.

SORBENT G VERDÜNNUNGSMITTEL EBV (PF91083) 1 x 7 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Zur Verdünnung der Proben in die Wells zu geben.

Inhalt: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung; enthält 0,09 % Natriumazid und 10 % Rinderserum. Gebrauchsfertig.

H₂SO₄ 0.3 M STOPPLÖSUNG (PF93602) 1x16 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: H₂SO₄ 0,3 mol/l, in gebrauchsfertiger Lösung.

Das Sicherheitsdatenblatt (MSDS) ist auf Anfrage erhältlich.

ABDECKFILM (2).

POLYEHTYLENBEUTEL (1).

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

- Inkubator bei 37°C
- Mikrotiterplatten-Reader, Wellenlänge 450 oder bei 450/620 nm, mit einer OD-Linearität bis mindestens 2,000
- Washer für Mikrotiterplatten (empfehlenswert) für ein Dispenservolumen zwischen 225-375 µl
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Normale Laborgläser: Zylinder, Teströhrchen etc.
- Mikropipetten für die exakte Pipettierung von 10, 100, 1000 µl
- Einweg-Handschuhe
- Timer
- Natriumhypochlorit-Lösung (5 %)
- Behälter zum Sammeln von potentiell infektiösem Material
- Saugfähiges Papier

5. LAGERUNG UND STABILITÄT NACH DEM ERSTEN ÖFFNEN

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

Das Verfallsdatum ist auf allen Kitkomponenten und dem Packungsetikett angegeben.

Die Reagenzien haben nach dem ersten Öffnen und/oder der Vorbereitung eine begrenzte Stabilität.

REAGENZ	KONDITIONEN
MIKROTITERPLATTE	5 Wochen bei 2-8 °C im Polyethylenbeutel
KALIBRATOREN/KONTROLLSERUM	5 Wochen bei 2-8 °C
KONJUGAT	5 Wochen bei 2-8 °C
SORBENT G	5 Wochen bei 2-8 °C
SUBSTRAT	bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C, 1 Woche bei 15-30 °C im Dunkeln
VERDÜNNUNGSMITTEL	bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C
WASCHPUFFER	2 Wochen bei 2-8 °C, 5 Tage bei 15-30 °C
STOPPLÖSUNG	bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEITSHINWEISE

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK.

Achtung: Dieser Kit enthält Bestandteile humanen Ursprungs, die mit einer FDA-geprüften Methode für HbsAg, Anti-HIV-1, Anti-HIV-2 und Anti-HCV-Antikörper negativ waren. Da keine Testmethode mit völliger Sicherheit ausschließen kann, dass Produkte humanen Ursprungs infektiöse Erreger enthalten, sollten alle Materialien humanen

Ursprungs als potentiell infektiös betrachtet werden. Alle Materialien sollten gemäß GLP („Gute Laborpraxis“) behandelt werden.

Entsorgung der Abfälle: Die Serum-Proben und die verwendeten Reagenzien müssen als infizierte Abfälle behandelt werden, das heißt, im Einklang mit den geltenden Vorschriften entsorgt werden.

- Gesundheits- und Sicherheitsinformationen
Nicht mit dem Mund pipettieren. Tragen Sie Einweg-Handschuhe und einen Augenschutz während des Umgangs mit Proben und der Testdurchführung. Waschen Sie sich danach gründlich die Hände.
- Die folgenden Reagenzien enthalten geringe Konzentrationen von schädlichen oder reizenden Substanzen:
 - e) Der Waschpuffer enthält Detergenzien.
 - f) Das Konjugat und die Kontrollen enthalten Phenol.
 - g) Das Substrat ist eine Säure.
 - h) Die Kontrollen enthalten 0,09 % Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei und Kupfer explosive Metallazide bilden.

Falls irgendeines der Reagenzien in Kontakt mit den Augen oder der Haut kommt, waschen Sie den Bereich intensiv mit Wasser.

- Mehrfach verwendbare Materialien oder Gegenstände sollten nach Gebrauch sterilisiert werden. Die bevorzugte Methode ist das Autoklavieren für eine Stunde bei 121 °C, Einwegmaterialien sollten autoklaviert oder verbrannt werden.
- Schwefelsäure (Stop Solution) und Salzsäure (wird für das Waschen der Laborgläser benötigt) sind ätzend und sollten mit entsprechender Sorgfalt behandelt werden. Bei Kontakt mit Augen oder Haut gründlich mit Wasser abwaschen.
- Neutralisierte Säuren oder anderer Flüssigabfall sollten mit einer ausreichenden Menge von Natriumhypochlorit mit einer Endkonzentration von mindestens 1,0 % dekontaminiert werden. Eine 30-minütige Behandlung mit Natriumhypochlorit (1 %) ist erforderlich, um eine effektive Dekontamination sicherzustellen.
- Verschüttete potentiell infektiöse Materialien sollten sofort mit saugfähigem Papier aufgewischt werden, und der kontaminierte Bereich sollte mit Natriumhypochlorit (1 %) nachgewischt werden, bevor die Arbeit fortgesetzt wird. Natriumhypochlorit sollte nicht bei verschütteter Flüssigkeit, die Säure enthält, verwendet werden, bevor die Flüssigkeit trocken aufgewischt wurde. Materialien, die für das Aufwischen verschütteter Flüssigkeiten verwendet wurden, inklusive der Handschuhe, sollten wie potentiell biogefährdender Abfall entsorgt werden. Autoklavieren Sie keine Materialien, die Natriumhypochlorit enthalten.

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- **Lagerung bei 2-8 °C**
- Bringen Sie alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-30 °C). Bringen Sie die Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder auf die empfohlene Lagerungstemperatur. **Es ist wichtig, bei der korrekten Temperatur zu arbeiten. Überprüfen Sie, dass der Thermostat nicht unterhalb 35 °C und nicht über 39 °C anzeigt.**
- Öffnen Sie die Packung mit den Streifen erst nach 30 Minuten bei Raumtemperatur.
- Verwenden Sie die Reagenzien nicht über das angegebene Verfalldatum hinaus. Mikrobiologische Kontamination der Reagenzien muss vermieden werden, da dies die Haltbarkeit des Produktes reduzieren und zu falschen Ergebnissen führen kann.
- Die Testdurchführung darf nicht verändert, die Reagenzien dürfen nicht durch Reagenzien von anderen Herstellern oder aus anderen Lots ersetzt werden, es sei denn, dass die Austauschbarkeit von Lots extra angegeben ist. Reduzieren Sie keine der Inkubationszeiten.
- Die für die Reagenzien verwendeten Laborgläser sollten gründlich mit 2M Salzsäure gewaschen und dann mit destilliertem oder deionisiertem Wasser von guter Qualität gespült werden.
- Vermeiden Sie Gefrierschränke mit Abtauautomatik für die Lagerung von Proben.
- Setzen Sie die Reagenzien keiner starken Lichteinstrahlung oder Hypochlorit-Dämpfen während der Lagerung oder der Inkubationsschritte aus.
- Lassen Sie die Wells während der Testdurchführung nicht trocken werden.
- Vermeiden Sie Verschleppungen beim Pipettieren. Es ist wichtig, dass die Pipetten nur für den alleinigen Gebrauch der verschiedenen Reagenzien eingesetzt werden.
- Das Berühren oder Bespritzen des Randes der Wells mit Konjugat sollte sorgfältig vermieden werden. Verschütten Sie keine Flüssigkeit aus den Wells.
- Enzymimmunoassays können gelegentlich einen „Edge-Effect“ zeigen, der durch eine Steigerung der Luftfeuchtigkeit während der Inkubationsschritte minimiert werden muss. Die Platten müssen mit Film abgedeckt und bei 37 °C entweder im Wasserbad (mit einem Rack oder einem Schwimmer, um die Platten zu halten, sofern nötig) oder in einem Inkubator inkubiert werden. Alternativ können die Platten in einem überprüften Analysengerät inkubiert werden. Weitere Details entnehmen Sie bitte der entsprechenden Gebrauchsanweisung des Gerätes. Verwenden Sie keine CO₂ Inkubatoren.
- Stellen Sie sicher, dass der Boden der Platte sauber und trocken ist, und dass vor dem Lesen der Platte keine Blasen auf der Oberfläche der Flüssigkeit vorhanden sind.
- Die Verwendung von stark hämolysierten Proben, unvollständig geronnenen Seren oder mikrobiell kontaminierten Proben führt zu falschen Ergebnissen.

- Die Benutzung der Methode mit automatischen Instrumenten muss von dem Anwender bestätigt werden
- Lesen Sie vor der Verwendung eines Gerätes sorgfältig die Gebrauchsanweisung des Herstellers, damit Sie zu folgenden Punkten Zusatzinformationen erhalten:
 - Installation und besondere Bedarfsartikel
 - Arbeitsprinzip, Hinweise zur Testdurchführung, Vorsichtsmaßnahmen und Risiken
 - Vorgegebene Spezifikationen des Herstellers und Arbeitsweise des Gerätes
 - Service und Wartung

7. PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

- Als Probenmaterial wird Serum eingesetzt, das auf die übliche Art aus der Vene unter Berücksichtigung der „Guten Laborpraxis“ entnommen wird. Das frische Serum kann 4 Tage bei 2-8 °C oder für einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert werden. Die Proben dürfen maximal 3-mal aufgetaut werden. Den Gebrauch von Tiefkühlschränken mit automatischem Abtausystem für die Aufbewahrung der Proben vermeiden. Aufgetaute Proben müssen vor Gebrauch sorgfältig geschüttelt werden. Hitzeinaktivierung der Probe vermeiden. Die Qualität einer Probe kann durch mikrobielle Kontamination ernsthaft beeinflusst werden. Sie führt zu falschen Ergebnissen.
- Stark lipämische, ikterische oder kontaminierte Proben sollten nicht in diesen Assay eingesetzt werden.
- **Es dürfen keine Plasmaproben in diesen Assay eingesetzt werden!**

8. TESTDURCHFÜHRUNG

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bereiten Sie die benötigte Anzahl von Teststreifen vor.
- Bereiten Sie den Waschpuffer vor: Verdünnen Sie den Washing Buffer 1:10 mit destilliertem Wasser (Beispiel 100 ml + 900 ml H₂O).

PIPETTIER- UND INKUBATIONSSCHRITTE

Verdünnen Sie die Proben 1:26, indem Sie 40 µl der Probe 1,0 ml verdünntes Diluent zufügen. Lassen Sie die erste Well für den Substratleerwert frei (100 µl Substrat und 100 µl Stop Solution pipettieren). 100 µl unverdünnte Kalibratoren und Negativkontrolle in die entsprechenden Wells ohne Sorbent G pipettieren. 50 µl Sorbent G und 50 µl der verdünnten Probe in die entsprechenden Wells pipettieren (Doppelbestimmungen werden empfohlen).

Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37 °C inkubieren. 4-mal waschen (300 µl, mit jeweils 30 Sekunden Einwirkzeit). 100 µl Konjugat in die Wells pipettieren (außer Substratleerwert). Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37 °C inkubieren. Erneut 4-mal wie oben beschrieben waschen. Schließlich 100 µl Substrat in alle Wells pipettieren (einschließlich der ersten Well für den Substratleerwert).

15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen. 100 µl Stop Solution in alle Wells pipettieren (auch Substratleerwert).

Die optische Dichte (OD) innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm oder 450/620 nm und schließlich bei 405 nm messen.

9. TESTSCHEMA

Die erste Well für den Substratleerwert frei lassen.

- 100 µl unverdünnte Kalibratoren und Negativkontrolle in die entsprechenden Wells pipettieren.
- In die Wells 50 µl Sorbent G und 50 µl der verdünnten Proben pipettieren.
- 45 Min. bei 37 °C inkubieren.
- 4-mal waschen (300 µl).
- 100 µl Konjugat in alle Wells pipettieren.
- 45 Min. bei 37 °C inkubieren.
- 4-mal waschen (300 µl).
- 100 µl Substrat in alle Wells pipettieren.
- 15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.
- 100 µl Stopplösung hinzufügen.
- Messen Sie die Extinktion innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm oder 450/620 nm.

10. VALIDITÄT DES TESTS

Subtrahieren Sie den Substratleerwert ($\leq 0,15$) von allen Extinktionen. Die Extinktion der Positiv-Kontrolle (CALIBRATOR 3) muss $\geq 1,0$ betragen, die Extinktion der Negativkontrolle muss $\leq 0,6$ fache des Cut-Off-Serums betragen. Die OD des Cut-Off muss $\geq 0,2$ bei 450 nm und $\geq 0,16$ bei 450/620 nm sein.

11. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Subtrahieren Sie die Blank Ods von allen übrigen Messungen.

Wenn die Extinktion der Probe höher als die des Cut-Off ist, enthält die Probe spezifische IgG-Antikörper.

Berechnen Sie die Ratio zwischen dem Extinktionswert der Probe und dem des Cut-Off. Die Ratio ist der Cut-Off-Index (COI).

Die Probe ist:

positiv: wenn der COI $> 1,2$ ist,

zweifelhaft: wenn der COI zwischen 0,8 und 1,2 (Cut-Off $\pm 20\%$) ist,

negativ: wenn der COI $< 0,8$ ist.

Falls das Ergebnis zweifelhaft ist, wiederholen Sie den Test. Wiederholen Sie den Test mit einer neuen Probe, falls das Ergebnis zweifelhaft bleibt.

Semiquantitative Auswertung

AU/ml

Tragen Sie die ODs der Kalibratoren nach Abzug der Blank ODs auf Millimeterpapier auf. Die dazugehörigen Titer der Probe können durch Interpolation abgelesen werden.

Der Grad der Immunität kann folgendermaßen interpretiert werden:

- IMMUN: wenn die Anti-VCA IgG-Konzentration > 24 AU/ml.
- NICHTIMMUN: wenn die IgG-Konzentration < 16 AU/ml ist.
- ZWEIFELHAFT: Ein Ergebnis zwischen diesen beiden Werten. In diesem Falle sollte die Probenbestimmung nach 2 Wochen wiederholt werden.

12. GRENZEN DES VERFAHRENS

Eine Serumprobe, die in der akuten Phase einer Infektion entnommen wurde, wenn nur IgM-Antikörper vorhanden sind, kann in diesem Test negativ ausfallen.

Die VCA-IgM-Werte sollten mit dem VCA IgM Kit bestimmt werden. Alternativ können Sie auch nach 8-14 Tagen erneut IgG bestimmen, um einen Anstieg zu überprüfen.

Zur Erstellung der Diagnose sollte das Testergebnis immer nur in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Informationen verwendet werden.

13. ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

Es wurden zehn Serumproben gemessen, die negativ für EBV-Antikörper waren und Antikörper gegen Cytomegalovirus, Herpes Simplex oder Varicella Zoster enthielten. In keinem Fall zeigte das Vorhandensein dieser Antikörper eine Kreuzreaktivität im EBV VCA IgG Test.

14. RELATIVE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

262 Proben wurden parallel mit dem Diesse-Kit und mit einem anderen kommerziellen Kit getestet. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

		REFERENZ	
		+	-
Diesse	+	232	0
	-	6	24

Die Diesse-Methode bietet 97,5 % Sensitivität und 100 % Spezifität.

15. PRÄZISION

Präzision in der Serie, ermittelt mit drei verschiedenen Lots

Cut-Off $n=15$	Lot 016	Lot 018	Lot 019
O.D.	0,406	0,446	0,552
CV%	10	6	3

Interassay- und Lot-zu-Lot-Präzision

	CUT-OFF-INDEX				
Probe	Lot 016	Lot 018	Lot 019	Mittelwert	CV%
1	0,3	0,5	0,4	0,4	25
2	1,7	1,6	1,9	1,7	9
3	2,2	2,9	2,6	2,6	14

16. "TROUBLESHOOTING" (PROBLEMLÖSUNGEN)

Wenn Sie sowohl die Angaben in der Gebrauchsanweisung für die Testdurchführung und deren Spezifikationen beachten als auch sorgfältig mit den Reagenzien umgehen und pipettieren, können Sie die folgenden Fehler vermeiden.

PROBLEM	MÖGLICHE URSACHE	MÖGLICHE PROBLEMLÖSUNG
Ungültiger Testrun (alle negativ)	Eins oder mehrere Reagenzien wurden nicht zugefügt oder in der falschen Reihenfolge.	Überprüfen Sie die Testdurchführung. Suchen Sie nach evt. ungenutzten Reagenzien. Wiederholen Sie den Test.
	Nichtreaktive Platte	Prüfen Sie den Code auf der Plattenpackung. (Der korrekte Code ist in der Gebrauchsanweisung unter Punkt 4 angegeben.)
		Prüfen Sie, ob die ungenutzte Platte feucht ist. (Das Silica-Gel Trockenmittel muss blassgelb sein.) Wiederholen Sie den Test.
Ungültiger Testrun (alle positiv)	Kontamination des Substrates	Nehmen Sie ein neues Substrat.
	Unvorschriftsmäßiges Waschen	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
Schlechte Präzision	Unvollständiges Waschen der Wells	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
	Unvorschriftsmäßiges Absaugen der Wells	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
	Pipettierfehler	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.
	Reagenzienzugabe zu langsam	Vermeiden Sie ein Austrocknen der Platte nach dem Waschschrift. Geben Sie sofort danach die Reagenzien zu.
	Vorhandensein von Luftblasen	Vermeiden Sie Luftblasen während des Pipettierens.
	Optischer Weg nicht sauber	Überprüfen Sie die Lichtquelle und den Detektor auf Verschmutzung. Reinigen Sie den Boden der Platte mit einem weichen Tuch.
Nicht ausreichende Farbentwicklung	Unvorschriftsmäßige Inkubationszeit oder -temperatur	Prüfen Sie die Temperaturkontrolle und die Zeitüberwachung.
		Beachten Sie die Vorschriften in der Gebrauchsanweisung.
	Unvorschriftsmäßiges Pipettiervolumen von Substrat	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.

17. LITERATUR

5. 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).
6. J. Middeldorp and P. Herbrink: Epstein Barr Virus specific marker molecules for early diagnosis of infectious mononucleosis. J. Virol. Methods 21: 133 (1988).
7. C. Valent Sumaya: Serological testing for Epstein Barr Virus - developments in interpretation. J. Inf. Dis. 151: 984 (1985).
8. 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).



ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

**ENZYWELL
EPSTEIN BARR VCA IgG**
REF 91055

(Ελληνικά)

1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΗΜΙΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ IgG ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΤΟΥ ΠΚΟΥ ΚΑΨΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΙΟΥ EPSTEIN-BARR ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ.

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 στα άτομα που πάσχουν από ανοσοκαταστολή. Ο ιός είναι διαδεδομένος σε όλη την υδρόγειο και το 1'80-90% 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, μπορεί 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 κατά 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 στην μέθοδο ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). Το αντιγόνο αποτελούμενο από μερικώς κεκαθαρισμένο EBV, συνδέεται με τη στερεά φάση. Οι ειδικές ανοσοσφαιρίνες συνδέονται με το αντιγόνο μέσω επώασης με αραιωμένο ανθρώπινο ορό. Μετά από εκπλύσεις για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν αντέδρασαν, γίνεται η επώαση με το συζυγές, που αποτελείται από ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι IgG σεσημασμένα με υπεροξειδάση.

Απομακρύνεται το συζυγές που δεν αντέδρασε και προστίθεται το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης.

Το χρώμα που σχηματίζεται είναι ανάλογο προς την συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων που βρίσκονται στον υπό εξέταση ορό.

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 96 τεστ
- **Φέρτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από τη χρήση.**

MT PLATE ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ 12x8 κυψελίδων ευαισθητοποιημένων με αντιγόνο του ιού Epstein-Barr.

Χρήση: Ανοίξτε το περίβλημα των ταινιών από την αντίθετη πλευρά που αναγράφεται ο κωδικός (VG ακολουθούμενα από τον αριθμό της παρτίδας) που χρησιμεύει για την ταυτοποίησή της, πάρτε τη βάση και τοποθετήστε τις απαραίτητες ταινίες. Βάλτε και πάλι πίσω στη σακούλα από πολυαιθυλένιο, που περιέχει γέλη πυριτίας τις ταινίες που δεν χρησιμοποιήσατε, αφαιρέστε τον αέρα και σφραγίστε την πιέζοντας το ειδικό σύστημα κλεισίματος.

CONJ ΣΥΖΥΓΤΕΣ 1 x 16 mL

Περιεχόμενο: διάλυμα ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-IgG σεσημασμένων με υπεροξειδάση, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη 0,05% και Bronidox 0,02%. Έτοιμο για χρήση χωρίς επιπλέον διάλυση.

CAL ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ 3 x 1.6 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός γνωστής συγκέντρωσης σε αντισώματα IgG, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον διάλυση. 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 - ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ (PF93910) 1 x 1.6 mL **ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

REF 91055 VCA IgG, 91056 VCA IgM, 91057 EBNA IgG, 91058 EA IgG, 91059 EA IgM

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

WASH BUF 10x ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ 10X (PF93603) 1 x 100 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Περιεχόμενο: Ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα (PBS) συμπυκνωμένο 10 φορές, που περιέχει Brij 0.5%.

Προετοιμασία: Αραιώστε τον απαιτούμενο όγκο σε αναλογία 1:10 με αποσταγμένο νερό για να παρασκευάσετε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης έτοιμο για χρήση. Αν σχηματιστούν κρύσταλλοι, διαλύστε τους στους 37°C πριν την αραιώση.

SAMP DIL 10 ΔΙΑΛΥΤΗΣ 10 (PF93621) 1 x 100 mL **ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων.

Περιεχόμενο: Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) με πρωτεΐνες 10% κ.ό, αζίδιο του νατρίου και χρωστική ουσία (πορτοκαλί του μεθυλίου).

SORBENT G ΔΙΑΛΥΤΗΣ EBV (PF91083) 1 x 7 mL **ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Τοποθετείται στις κυψελίδες για την αραιώση των δειγμάτων.

Περιεχόμενο: Ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα (PBS) με αζίδιο του νατρίου 0,09% και βόειο ορό 10%. Έτοιμο για χρήση.

SUBS TMB ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (PF93619) 1x12 mL Έτοιμο για χρήση **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Περιεχόμενο: Τετραμεθυλβενζιδίνη 0,26 mg/mL και H₂O₂ 0,01% σταθεροποιημένα σε κυτταρικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (PF93602) 1 x 16 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Διάλυμα H₂SO₄ 0.3 mol/L έτοιμο για χρήση.

ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΤΑΙΝΙΑ (2).

ΣΑΚΟΥΛΑ ΑΠΟ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟ (1).

ΑΛΛΟ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ ΑΛΛΑ ΜΗ ΣΥΝΟΔΕΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.

- Επωαστήριο σε 37°C
- Αναγνώστης μικροπλακιδίων (μήκος κύματος 450 ή 450/620 nm και 405 nm, με γραμμικότητα μέχρι Ο.Π. >= 2,000)
- Συσκευή έκπλυσης μικροπλακιδίων (μη απαραίτητη) ικανότητας 225-375 μl
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
- Γάντια μίας χρήσης
- Χρονόμετρο
- Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5%
- Δοχεία για την απόρριψη των δυνητικά μολυσματικών υλικών.
- Απορροφητικό χαρτί
- Στάνταρντ υάλινος εξοπλισμός εργαστηρίου: κύλινδροι, δοκιμαστικοί σωλήνες, κ.λ.π.
- Μικροπιπέτες που αναρροφούν με ακρίβεια όγκους 10,100,1000 μL διαλύματος

5. ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

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

Η ημερομηνία λήξης είναι τυπωμένη πάνω σε κάθε στοιχείο καθώς και πάνω στην ετικέτα της συσκευασίας.

Τα Αντιδραστήρια έχουν περιορισμένη διάρκεια σταθερότητας μετά το άνοιγμα και/ή την προετοιμασία:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ

ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ

ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ ΚΑΙ ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ

ΣΥΖΥΓΕΣ

SORBENT G

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ

ΣΥΝΘΗΚΕΣ

5 εβδομάδες στους 2/8°C μέσα στην σακούλα από πολυαιθυλένιο

5 εβδομάδες στους 2/8°C

5 εβδομάδες στους 2/8°C

5 εβδομάδες στους 2/8°C

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C, 1 εβδομάδα σε 15/30°C στο σκοτάδι

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

έτοιμο για χρήση 2 εβδομάδες σε 2/8°C, 5 ημέρες σε 15/30 °C

Rif. IO - 09/020 – Inf. Tecn. 91055 – Ed. 09.07.2010

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

6. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΟΔΗΓΙΕΣ**ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΤΕ ΣΤΟΥΣ 2-8°C****Προσοχή:**

Αυτή η συσκευασία περιέχει υλικά ανθρώπινης προέλευσης που έχουν περάσει από ελέγχους και έχουν βρεθεί αρνητικά, σε εγκεκριμένα από την FDA τεστ, τόσο όσον αφορά την ανίχνευση του HbsAg όσο και για τα αντισώματα αντι-HIV-1, αντι-HIV-2 και αντι-HCV. Επειδή κανένα διαγνωστικό τεστ δεν προσφέρει απόλυτη εγγύηση απουσίας μολυσματικών παραγόντων, κάθε υλικό ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να θεωρείται ως δυνητικά μολυσματικό. Χρησιμοποιείτε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα παίρνοντας όλες τις προφυλάξεις που προβλέπονται από τους κανονισμούς ασφαλείας του εργαστηρίου.

Διαχείριση των κατάλοιπων: τα δείγματα του ορού και ο αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να αντιμετωπίζονται ως κατάλοιπα δυνητικά μολυσματικά και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις ισχύουσες διατάξεις.

Οδηγίες για την προσωπική σας ασφάλεια

7. Μην κάνετε αναρρόφηση με το στόμα. Χρησιμοποιείτε γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά όταν χειρίζεστε τα δείγματα. Πλένετε πολύ καλά τα χέρια σας μετά από κάθε ανάλυση.
8. Η περιεκτικότητα των παρακάτω αντιδραστηρίων σε βλαβερές ή ερεθιστικές ουσίες, είναι χαμηλή:
 - α) το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης περιέχει ουσίες καθαρισμού
 - β) το συζυγές περιέχει φαινόλη
 - γ) το υπόστρωμα είναι όξινο
 - δ) Οι βαθμονομητές περιέχουν Αζίδιο Νατρίου (0,09%) το οποίο μαζί με τον χαλκό και τον μόλυβδο μπορεί να σχηματίσει ισχυρά εκρηκτικά αζιδικά ιζήματα μετάλλων:
Αν ένα αντιδραστήριο έρθει σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνετε με άφθονο νερό.
9. Οι συσκευές που δεν είναι μίας χρήσης, πρέπει να αποστειρώνονται, κατά προτίμηση στον κλίβανο, για 1 h σε 121°C, ενώ το υλικό μίας χρήσης πρέπει να μπαίνει στον κλίβανο ή να αποτεφρώνεται.
10. Το θειικό οξύ, που περιέχεται στο Stop Solution και το υδροχλωρικό οξύ που χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα του υάλινου εξοπλισμού, είναι διαβρωτικά και γι' αυτό πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή. Σε περίπτωση που έρθουν σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνετε με άφθονο νερό.
11. Εξουδετερωμένα οξέα και άλλα υγρά απόβλητα πρέπει να απολυμαίνονται προσθέτοντας υποχλωριώδες νάτριο, τόσο όσο χρειάζεται ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι τουλάχιστον 1%. Μια έκθεση σε υποχλωριώδες νάτριο 1% για 30 λεπτά, υπό κανονικές συνθήκες, είναι αρκετή για να γίνει μία αποτελεσματική απολύμανση.
12. Τυχόν χυμένα υγρά, δυνητικά μολυσματικά, πρέπει να καθαρίζονται αμέσως με απορροφητικό χαρτί και η επιφάνεια να απολυμαίνεται, για παράδειγμα με υποχλωριώδες νάτριο 1%, πριν να συνεχίσετε την διαδικασία ανάλυσης. Αν τα υγρά περιείχαν ένα οξύ, τότε στεγνώστε πολύ καλά την επιφάνεια πριν χρησιμοποιήσετε το υποχλωριώδες νάτριο. Όλα τα υλικά, που χρησιμοποιήθηκαν για να καθαριστούν τυχόν χυμένα υγρά, πρέπει να απορρίπτονται ως δυνητικά μολυσματικά απόβλητα. Μην βάζετε στον κλίβανο υλικά που περιέχουν υποχλωριώδες νάτριο.

Οδηγίες για την ανάλυση

14. Πριν από την χρήση φέρτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C) Βάλτε και πάλι τα αντιδραστήρια στη συνιστώμενη θερμοκρασία αποθήκευσης, αμέσως μετά τη χρήση. **Η σωστή θερμοκρασία είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την επώαση των ταινιών. Βεβαιωθείτε ότι ο θερμοστάτης δεν κατεβαίνει κάτω από τους 35°C και δεν ανεβαίνει πάνω από τους 39°C.**
Ανοίξτε την σακούλα με τις ταινίες (strip) αφού την έχετε αφήσει τουλάχιστον μισή ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
15. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους. Να αποφεύγετε την μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων γιατί αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας του προϊόντος και μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
16. Μην αλλάζετε την όλη Διαδικασία και μην αντικαταστήσετε τα αντιδραστήρια με άλλα διαφορετικής μάρκας ή με άλλα από διαφορετικές παρτίδες, εκτός και αν το αντιδραστήριο είναι κοινό σε όλες τις παρτίδες. Μην μειώνετε τον υποδεικνυόμενο χρόνο επώασης.
17. Όλος ο υάλινος εξοπλισμός πρέπει να απολυμαίνεται προσεκτικά με υδροχλωρικό οξύ 2M και να ξεπλένεται με αποσταγμένο ή με απιονισμένο νερό.
18. Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε ισχυρό φωτισμό ούτε σε υποχλωριώδεις ατμούς, τόσο κατά την αποθήκευσή τους όσο και κατά την επώασή τους.
19. Οι κυψελίδες δεν πρέπει να ξεραίνονται, κατά την διάρκεια των τεστ.

20. Να αποφεύγετε την διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιείτε πάντοτε τις ειδικές πιπέτες.
21. Μην ακουμπάτε το χέιλος της κυψελίδας με το συζυγές. Μην φυσάτε πάνω στα μικροπλακίδια.
22. Οι ανοσοενζυμικές αναλύσεις μπορεί να παρουσιάσουν καμιά φορά στα άκρα ένα ειδικό φαινόμενο ("edge effect"), το οποίο μπορεί να ελαχιστοποιηθεί αυξάνοντας τον βαθμό υγρασίας κατά την επώαση. Τα πλακίδια πρέπει να καλύπτονται με το ειδικό κάλυμμα και να επωάζονται στους 37°C ή σε ζεστό υδατόλουτρο, τοποθετώντας τα πάνω σε ένα υποστήριγμα, ή στη συσκευή επώασης. Ως εναλλακτική λύση τα πλακίδια μπορεί να επωαστούν σε έναν κατάλληλο αναλύτη. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε το εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής. Μην χρησιμοποιείτε συσκευές επώασης που λειτουργούν με CO₂.
23. Πριν από την ανάγνωση του πλακιδίου, βεβαιωθείτε ότι ο πυθμένας του είναι καθαρός και στεγνός και ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στην επιφάνεια του υγρού.
24. Τα δείγματα που παρουσιάζουν ισχυρή αιμόλυση, οροί με ατελή πήξη, ή δείγματα που παρουσιάζουν μικροβιακή μόλυνση, μπορεί να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα.
25. Η χρήση ενός κιτ με αυτόματες συσκευές, πρέπει να ελεγχθεί και να επικυρωθεί από τον χρήστη.
26. Διαβάστε με προσοχή το εγχειρίδιο χρήσης κάθε συσκευής που χρησιμοποιείτε, και ειδικά τα εξής σημεία:
 - εγκατάσταση και ειδικές προδιαγραφές
 - λειτουργική αρχή, οδηγίες, προφυλάξεις, κίνδυνοι
 - προδιαγραφές του κατασκευαστή και λειτουργικές αποδόσεις της συσκευής
 - συντήρηση και τεχνική υποστήριξη.

7. ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Το δείγμα αποτελείται από ορό που προέρχεται από αίμα που έχει συλλεχθεί με φλεβική λήψη και έχει περάσει από όλες τις διαδικασίες που προβλέπονται από τους βασικούς κανονισμούς των εργαστηρίων. Ο νωπός ορός μπορεί να διατηρηθεί για 4 ημέρες στους 2/8°C, ενώ για μεγαλύτερη χρονική περίοδο καταψύξετε στους -20°C. Το δείγμα μπορεί να αποψυχθεί το πολύ 3 φορές. Αποφεύγετε τη χρήση αυτο-αποψυχόμενων ψυγείων για τη συντήρηση των δειγμάτων. Μετά από την απόψυξη και πριν να το ρίξετε στην κυψελίδα, ανακινήστε το καλά.. Η μικροβιακή μόλυνση μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα του δείγματος, και να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα.

Δείγματα με ισχυρή αιμόλυση, με ίκτερο, λιπαιμικά ή μολυσμένα, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται.

Το τεστ δεν μπορεί να γίνει πάνω σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

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

Αραιώστε τα δείγματα σε αναλογία 1:26 ρίχνοντας 40 μL ορού σε 1 mL διαλύτη. Αφήστε μία κυψελίδα ελεύθερη για την ανάλυση του τυφλού, ρίχνοντας μέσα μόνο 100 μL υποστρώματος. Ρίξτε 50 μL Ροφητή (Sorbent) G και 50 μl από κάθε αραιωμένο δείγμα σε κάθε κυψελίδα (συνιστάται η εκτέλεση της ανάλυσης να γίνει εις διπλούν). Σε μία ταινία ρίξτε τον αρνητικό ορό ελέγχου (OXI ΑΡΑΙΩΜΕΝΟ) και τους βαθμονομητές (OXI ΑΡΑΙΩΜΕΝΟΥΣ) (100 μL ανά κυψελίδα χωρίς τον Ροφητή G). Κατά προτίμηση ρίξτε εις διπλούν. Καλύψτε τις κυψελίδες με την προστατευτική ταινία και βάλτε τις να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C. Μετά από 4 εκπλύσεις, διαρκείας 30 δευτερολέπτων η κάθε μία (300 μl) προσθέστε 100 μL συζυγούς σε κάθε κυψελίδα και βάλτε τις και πάλι να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C, καλύπτοντάς τις με την προστατευτική ταινία. Ξεπλύνετε και πάλι το πλακίδιο 4 φορές, όπως υποδεικνύεται παραπάνω, και στη συνέχεια ρίξτε το Υπόστρωμα, 100 μL/ανά κυψελίδα.. Μετά από 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος διακόψτε την ενζυμική αντίδραση με 100 μL Stop Solution. Διαβάστε την Απορρόφηση (Ο.Π) στα 450 nm ή στα 450/620 nm μέσα σε 30 λεπτά.

9. Διάγραμμα της ανάλυσης

Αφήστε ελεύθερη μία κυψελίδα για το τυφλό.

STEP 1 Ρίξτε 50 μl Ροφητή (Sorbent) G, 50 μL αραιωμένου ορού και 100 μl αρνητικού ορού ελέγχου και βαθμονομητών στις κυψελίδες της ταινίας.

-

Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C

-

Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 μl)

-

STEP 2 Ρίξτε 100 μL συζυγούς σε κάθε κυψελίδα

-

Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C

-

- Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 µl)
- STEP 3 Ρίξτε 100 µL Υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα
- Επωάστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- STEP 4 Προσθέστε 100 µL Stop Solution
- Διαβάστε την Ο.Π. στα 450 nm μέσα σε 30 λεπτά

10. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Αφαιρέστε την τιμή του τυφλού (<0.150) από όλες τις άλλες τιμές. Ο θετικός ορός ελέγχου (ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΗΣ 3) πρέπει να έχει Ο.Π. ≥ 1.0 . Ο λόγος μεταξύ της τιμής του Αρνητικού ορού και του Cut-off πρέπει να είναι ≤ 0.6 . Η Ο.Π. του Cut-off πρέπει να είναι $\geq 0,2$ στα 450 nm και $\geq 0,16$ στα 450/620 nm.

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Ποιοτικά αποτελέσματα

Αν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος είναι μεγαλύτερη από τον Cut-off (ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΗΣ 1) το δείγμα προκύπτει θετικό λόγω της παρουσίας των ειδικών IgG.

Υπολογίστε τον λόγο (INDEX) μεταξύ της μέσης τιμής των Ο.Π. του υπό ανάλυση δείγματος, και εκείνης του Cut-off (ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΗΣ 1). Το δείγμα θα κριθεί:

Θετικό: όταν ο λόγος είναι > 1.2 .

Αμφίβολο: $= \pm 20\%$ του Cut-off.

Αρνητικό: όταν ο λόγος είναι < 0.8 .

Σε περίπτωση αμφίβολου αποτελέσματος, επαναλάβετε το τεστ. Αν το αποτέλεσμα παραμένει αμφίβολο επαναλάβετε την αιμοληψία.

Ημιποσοτικά αποτελέσματα

Αυθαίρετες μονάδες (AU)

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν σε αυθαίρετες μονάδες μεταφέροντας την Ο.Π. του δείγματος σε μία καμπύλη που έχει προκύψει από τις τιμές των 3 βαθμονομητών συν την τιμή του αρνητικού ορού ελέγχου που έχει 0 AU/ml.

- *ΑΝΟΣΟΣ:* όταν η συγκέντρωση των IgG VCA στο δείγμα, είναι > 24 AU/mL
- *ΜΗ ΑΝΟΣΟΣ:* όταν η συγκέντρωση των IgG αντι-VCA είναι < 16 AU/mL.
- *ΑΜΦΙΒΟΛΟΣ:* όταν η συγκέντρωση κυμαίνεται μεταξύ 16 και 24. Σε μία τέτοια περίπτωση συνιστάται η επανάληψη του προσδιορισμού εις διπλούν. Αν το δείγμα παραμένει αμφίβολο, επαναλάβετε την αιμοληψία μετά από 2 εβδομάδες περίπου.

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

Οροί που έχουν συλλεχθεί κατά την οξεία φάση της λοίμωξης, όταν υπάρχουν μόνο αντισώματα IgM, μπορεί να προκύψουν αρνητικοί με αυτή την τεχνική.

Η τιμή των IgM αντι-VCA πρέπει να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας το kit VCA IgM. Εναλλακτικά θα αναλυθεί ένα δεύτερο δείγμα που θα έχει συλλεχθεί 8-14 ημέρες μετά, για να εξακριβωθεί τυχόν αύξηση των IgG. Σε κάθε περίπτωση το αποτέλεσμα του τεστ θα πρέπει να συνεκτιμηθεί με άλλα δεδομένα προερχόμενα από άλλες διαγνωστικές έρευνες.

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Οροί 10 ασθενών αρνητικών προς τον ιόν του Epstein Barr περιείχαν αντισώματα κατά ιόν όπως ο Κυτταρομεγαλοϊός, ο Απλός Έρπητας και ο ιός Ανεμοβλογιάς/Έρπητα Ζωστήρα. Σε καμία περίπτωση αυτά τα αντισώματα δεν έκαναν διασταυρούμενες αντιδράσεις στο τεστ EBV VCA IgG.

14. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Αναλύθηκαν 262 δείγματα με το kit DIESSE και παράλληλα και με ένα εμπορικό. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

		ΑΝΑΦΟΡΑ	
		+	-
DIESSE	+	232	0
	-	6	24

Η μέθοδος ENZYWELL έχει ευαισθησία 97,5% και ειδικότητα 100%.

15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Ακρίβεια κατά μία ανάλυση που έγινε με 3 διαφορετικές παρτίδες:

Cut-off n=15	Παρτίδα 016	Παρτίδα 018	Παρτίδα 019
O.Π.	0.406	0.446	0.552
CV%	10	6	3

Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων και παρτίδων:

Δείγμα	INDEX			Μ. Τιμή	CV%
	Παρτίδα 016	Παρτίδα 018	Παρτίδα 019		
1	0.3	0.5	0.4	0.4	25
2	1.7	1.6	1.9	1.7	9
3	2.2	2.9	2.6	2,6	14

16. ΟΛΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

ΠΡΟΒΛΗΜΑ	ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ ΤΟΥ ΣΦΑΛΜΑΤΟΣ	ΤΙ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΚΑΝΕΤΕ
Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα αρνητικά)	Δεν προστέθηκαν ένα ή περισσότερα αντιδραστήρια ή προστέθηκαν σε λανθασμένη σειρά.	Ελέγξτε και πάλι την όλη διαδικασία. Ελέγξτε μήπως δεν έχει προστεθεί κάποιο αντιδραστήριο. Επαναλάβετε το τεστ.
	Το πλακίδιο δεν αντιδρά	Ελέγξτε των κωδικό στον φάκελο του πλακιδίου (βλ. οδηγίες χρήσης σημείο 4 περί λανθασμένου κωδικού).
		Ελέγξτε αν υπάρχουν ίχνη υγρασίας στο πλακίδιο που δεν αντιδρά. (Η γέλη πυριτίας πρέπει να έχει χρώμα κίτρινο ώχρα). Επαναλάβετε το τεστ..
Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα θετικά)	Μόλυνση του υποστρώματος	Πάρτε μία νέα ποσότητα υποστρώματος
	Ανεπαρκής έκπλυση	Βεβαιωθείτε ό,τι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά.
Χαμηλό επίπεδο ακρίβειας	Ανεπαρκής αναρρόφηση των κυψελίδων	Βεβαιωθείτε ό,τι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά
	Λανθασμένη αναρρόφηση	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας.
	Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται με πολύ αργό ρυθμό	Να αποφεύγετε την ξήρανση του πλακιδίου μετά την έκπλυση. Προσθέστε αμέσως τα αντιδραστήρια
	Υπάρχουν φυσαλίδες αέρα	Να αποφεύγετε τον σχηματισμό φυσαλίδων κατά την αναρρόφηση.
	Η οπτική διαδρομή δεν είναι διαυγής	Ελέγξτε αν η φωτεινή πηγή είναι καθαρή. Καθαρίστε το πλακίδιο με ένα χαρτομάντιλο
Ανεπαρκής θερμοκρασία	Λανθασμένος ο χρόνος ή η θερμοκρασία της επώασης	Ελέγξτε τον θερμοστάτη και τον χρόνο επώασης.
		Ακολουθήστε πιστά τις οδηγίες χρήσης.
	Η ποσότητα του υποστρώματος που	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας

έχει προστεθεί, δεν είναι αρκετή.

17. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

9. 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).
10. J. Middeldorp and P. Herbrink: Epstein Barr Virus specific marker molecules for early diagnosis of infectious mononucleosis. J. Virol. Methods 21: 133 (1988).
11. C. Valent Sumaya: Serological testing for Epstein Barr Virus - developments in interpretation. J. Inf. Dis. 151: 984 (1985).
12. J. Luka, R.C. Chase and G. Pearson: A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against the major EBV-associated antigens. I. Correlation between ELISA and immunofluorescence titers using purified antigens. J. Immunol. Methods 67: 145 (1984).



INSTRUCCIONES DE USO

ENZYWELL EPSTEIN BARR VCA IgG

REF 91055

(Español)

1. INDICACIONES

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

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

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

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

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

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

3 PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

El antígeno, constituido por EBV parcialmente purificado está unido a la fase sólida. Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno.

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

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

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

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.

Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 pocillos recubiertos de antígenos de Epstein-Barr Virus.

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

CONJ CONJUGADO 1x16 mL

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

CAL CALIBRADORES 3 x 1.6 mL

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

Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

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

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

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

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

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

SAMP DIL 10 DILUYENTE 10 (PF93621) 1x100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

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

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

Poner dentro de los pocillos para diluir las muestras.

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

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Listo para su uso **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H₂O₂ 0,01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Solución de H₂SO₄ 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2).

BOLSA DE PLÁSTICO (1).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- Incubador a 37°C
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linealidades hasta OD >= 2,000)
- Lavador de Microplacas (no indispensable) para dispensar volúmenes entre 225-375 µL
- Agua Destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 10,100,1000 µL de solución
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel adsorbente.

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

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

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

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

6. PRECAUCIONES DE USO

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

Cuidado:

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

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

Informaciones de Salud y Seguridad:

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

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

Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta. Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C ó por encima de 39°C..**
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
3. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
4. Lavar con ácido hidroc্লórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo..
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" ("efecto filo") que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador. Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO₂.
10. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
11. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación microbiana.
12. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.

13. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:
- instalación y requisitos específicos
 - principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
 - especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
 - mantenimiento y servicio técnico

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

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

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

El test no se puede aplicar a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO

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

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

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

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

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

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST
--

- | | |
|--------|--|
| STEP 1 | Poner 50 µL de Sorbent G, 50 µL de suero diluido y 100 µL de calibradores y controle en los pocillos.
-
Incubar 45 min. a 37°C
-
Lavar 4 veces (300 µL)
- |
| STEP 2 | Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo
-
Incubar 45 min. a 37°C
-
Lavar 4 veces (300 µL)
- |
| STEP 3 | Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo
-
Incubar 15 min. a T.A.
- |
| STEP 4 | Añadir 100 µL de Solución Bloqueante
-
Leer la absorbancia a 450 nm dentro de 30 min |

10. VALIDACIÓN DEL TEST

Restar el valor del blanco (≤ 0.150) a todas las otras lecturas. Los valores en D.O. del suero de control positivo (CALIBRADOR 3) deben estar ≥ 1.0 . La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser ≤ 0.6 . La O.D. del cut-off debe ser $\geq 0,2$ a 450 nm e $\geq 0,16$ a 450/620 nm

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

1. Resultados cualitativos

Si el valor de la absorbancia de la muestra es superior al Cut-off (CALIBRADOR 1) la muestra resulta positiva por la presencia de IgG específicas para el antígeno.

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

La muestra se considera:

Inmune: si la concentración es > 1.2 .

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

No-inmune: si la concentración es < 0.8 .

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

2. Resultados semicuantitativos

Unidades Arbitrarias (AU)

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

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

12. LIMITACIONES

Los sueros recogidos durante la fase aguda de la infección, cuando están presentes solamente los anticuerpos IgM, podrían resultar negativos con este procedimiento.

El nivel de las IgM anti-VCA tendría que ser determinado usando el kit VCA IgM. Alternativamente, se analizará una segunda muestra de suero recogida 8-14 días después para determinar un eventual incremento del nivel de anticuerpos IgG.

El resultado de test tendría que ser evaluado conjuntamente con otros resultados procedentes de otros procedimientos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

10 sueros de pacientes negativos al virus de Epstein Barr contenían anticuerpos con virus como Cytomegalovirus, Herpes Simplex, Varicella Zoster. En ningún caso la presencia de dichos anticuerpos ha evidenciado reactividad cruzada en el test EBV VCA IgG.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

262 muestras han sido analizadas en paralelo con el kit Diesse y con otro kit comercial. Los resultados están resumidos en la tabla siguiente :

		REFERENCIA	
		+	-
DIESSE	+	232	0
	-	6	24

El kit Enzywell ofrece una sensibilidad del 97,5% y especificidad del 100%.

15. PRECISIÓN

Reproducibilidad intra-ensayo realizada sobre 3 lotes distintos

<i>Cut-off n=15</i>	<i>Lote 016</i>	<i>Lote 018</i>	<i>Lote 019</i>
<i>D.O.</i>	0.406	0.446	0.552
<i>CV%</i>	10	6	3

Precisión entre series y lotes

	INDEX				
Muestra	Lote 016	Lote 018	Lote 019	Media	CV%
1	0.3	0.5	0.4	0.4	25
2	1.7	1.6	1.9	1.7	9
3	2.2	2.9	2.6	2,6	14

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

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

17. 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).



INSTRUCTIONS POUR L'EMPLOI

ENZYWELL EPSTEIN BARR VCA IgG QUANTITATIVE

REF 91055

(Français)

1. UTILISATION

METHODE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE DES ANTICORPS I gG AGISSANT CONTRE LES ANTIGENES DE LA CAPSIDE DU VIRUS D'EPSTEIN BARR DANS LE SERUM HUMAIN, EN TANT QU'AIDE AU DIAGNOSTIC D'UNE INFECTION DUE AU VIRUS DE L'EPSTEIN BARR.

2. INTERET CLINIQUE

Le virus d'Epstein Barr (EBV) appartient au groupe Herpes viridae. La mononucléose est la situation clinique la plus fréquente. L'EBV est également associé au lymphome de Burkitt, au cancer du rhinopharynx et à certains syndromes lymphoprolifératifs B, chez les sujets immunodéprimés.

Les anticorps anti-EBV sont présents 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 chez les sujets à MNI, en particulier quand ils ont moins de 14 ans et, en outre, ils peuvent rester présents dans le sérum plus d'un an après l'infection. Si elle n'est accompagnée d'aucune autre analyse, la recherche des anticorps hétérophiles peut entraîner un diagnostic erroné.

C'est la raison pour laquelle la recherche des anticorps spécifiques anti-EBV est importante. En particulier, la recherche des anticorps agissant contre l'antigène du capsid viral (VCA) et l'antigène nucléaire peut être très utile.

Pour les autres pathologies liées à l'EBV, le diagnostic sérologique se base sur la recherche des anticorps spécifiques de l'EBV.

Les anticorps anti-VCA (IgG et IgM) et les anticorps anti-EA (IgG) sont détectés au moment d'une primo-infection. Les anticorps anti-EBNA apparaissent plus tardivement.

Un profil dissocié (présence d'IgG anti-VCA et absence d'IgG anti-EBNA) marque une primo-infection. Il pourra être confirmé par des IgM anti-VCA. Un profil non dissocié (présence d'IgG anti-VCA et d'IgG anti-EBNA) signe une infection ancienne.

3. PRINCIPE

Le test se base sur le principe ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). L'antigène EBV, partiellement purifié, est fixé sur la microplaque. Pendant l'incubation avec le sérum humain dilué, les immunoglobulines spécifiques, éventuellement présentes, se lient à l'antigène. Les lavages successifs, permettent d'éliminer les protéines non liées à l'antigène. Le conjugué marqué (à l'anticorps monoclonal anti-IgG humaines) est alors ajouté avant la deuxième phase d'incubation.

Le conjugué non fixé à l'antigène est éliminé par un nouveau lavage. L'ajout du substrat provoque l'apparition d'une coloration.

L'intensité de la couleur qui apparaît dépend de la concentration en anticorps spécifiques présents dans le sérum examiné.

4. CONTENU DU KIT

Le kit permet de réaliser 96 réactions.

Porter les réactifs à température ambiante avant l'utilisation.

MT PLATE MICROPLAQUE 12 x 8 puits sensibilisés avec de l'antigène de la capsid du virus d'Epstein Barr.

Utilisation : Découper le sachet du côté opposé au code (VG, suivi par le numéro du lot) qui sert à son identification. Sortir le support et les barrettes nécessaires du papier d'emballage et placer les barrettes non utilisées dans le sachet en plastique avec le gel de silice. Chasser l'air du sachet et le fermer en exerçant une pression sur la fermeture.

CONJ CONJUGUE 1 x 16 mL

Composition : Anticorps monoclonaux anti-IgG humaines marqués à la peroxydase, dans un tampon contenant 0,05 % de phénol et 0,02 % de Bronidox..

Préparation : Prêt à l'emploi.

CAL CALIBRATEURS 3 x 1.6 mL

Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgG anti-VCA, dans un tampon phosphate à 0,01mol/l avec 1 % de BSA et 0.09 % d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution. 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 - CONTROLE NEGATIF IgG (PF93100) 1 x 1.6 mL **INTERCHANGEABLE PARMIS LES LOTS**
DU PANEL EBV REF 91055 VCA IgG, 9105 VCA IgM6, 91057 EBNA IgG, 91058 EA IgG, 91059 EA IgM.

Composition : Sérum humain dilué dans un tampon phosphate à 0,01mol/l avec 1 % de BSA et 0.09 % d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

SORBENT G DILUANT EBV 1 x 7mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : Solution tamponnée saline (PBS), sérum de veau venant de naître 10 %, azide de sodium 0.09 %, méthyl orange 5 mg/ml (1 %). Prêt à l'emploi.

WASH BUF 10x TAMPON DE LAVAGE 10X (PF93603) 1 x 100 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : Solution saline tamponnée, concentrée 10 fois ; contient 0.5 % de brij.

Préparation : Diluer à 1/10 avec de l'eau distillée pour obtenir un tampon de lavage prêt à l'emploi.

En présence de cristaux : chauffer la solution à 37 °C pour les solubiliser, puis réaliser la dilution.

SAMP DIL 10 DILUANT 10 (PF93611) 1 x 100 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Pour diluer les échantillons de sérum.

Composition : Solution protéique, additionnée d'azide de sodium 0.09 % et de méthylorange en guise de colorant.

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1 x 12 mL Prêt à l'emploi **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : Tétraméthylbenzidine (à 0,26 mg/ml) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ à 0.01 %) stabilisé dans un tampon citrate (à 0,05 mol/l). pH = 3,8.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUTION D'ARRET (PF93602) 1 x 16 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : H₂SO₄ (à 0,3 mol/l) en solution prête à l'emploi.

SACHET EN POLYETHYLENE (1)

FEUILLES ADHESIVES (2)

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Incubateur à 37 °C
- Lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 ou 450/620 nm, avec linéarité jusqu'à >= 2.000)
- Laveur de microplaques (pas indispensable) capable de fournir des volumes de 225-375 µl
- Eau distillée ou désionisée
- Verrerie normale de laboratoire (éprouvettes, pipettes, etc...)
- Micropipette pour le prélèvement précis de 10, 100, 1000 µl de solution
- Gants à jeter
- Compte-minutes
- Solution 5 % de sodium hypochlorite
- Récipients pour les matériaux potentiellement infectieux
- Papier absorbant

5. MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver les réactifs à 2-8 °C. La date de péremption est imprimée sur chaque flacon et sur l'étiquette apposée sur la confection.

Les réactifs ont une stabilité limitée après l'aperture et/ou la préparation.

REACTIF

MICROPLAQUE

SERUM DE CONTROLE/CALIBRATEURS

CONJUGUE

SUBSTRAT

DILUANT

CONDITIONS

5 semaines à 2/8 °C, sachet en polythène.

5 semaines à 2/8 °C.

5 semaines à 2/8 °C.

jusqu'à péremption à 2/8 °C, 1 semaine à 15/30 °C, conserver dans l'obscurité.

jusqu'à péremption à 2/8 °C.

TAMPON DE LAVAGE	prêt à l'emploi 2 semaines à 2/8 °C, 5 jours à 15/30 °C.
SORBENT G	5 semaines à 2/8 °C.
SOLUTION D'ARRET	jusqu'à péremption à 2/8 °C.

6. PRECAUTIONS D'UTILISATION **POUR DIAGNOSTIC IN VITRO.**

ATTENTION :

Ce kit contient des matériaux d'origine humaine. Bien que tous les produits d'origine humaine aient subi un contrôle de dépistage négatif, concernant les anticorps anti-VIH 1 et 2, les anticorps anti-VHC et l'Ag HBs en utilisant des méthodes approuvées par la FDA, ils doivent cependant être maniés comme étant des produits potentiellement infectieux.

Elimination des résidus: les échantillos de serum et les réactifs usages doivent être traités come des déchets infectés, et donc éliminés conformément aux dispositions de loi en vigueur.

PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS POUR LA SECURITE PERSONNELLE

1. Ne pas pipeter avec la bouche. Porter des gants à jeter et des protections pour les yeux quand on manie des échantillons et pendant le test. Se laver soigneusement les mains une fois que le test est terminé.
2. Les réactifs suivants contiennent de faibles concentrations de substances nocives ou irritantes :
 - a) Le tampon de lavage contient des détergents
 - b) Le conjugué et les contrôles contiennent du phénol
 - c) Le substrat est acide.
 - d) Les calibrateurs contiennent l'azide de sodium (0.09 %). Les azides peuvent réagir avec les métaux des canalisations et donner ainsi naissance à des composés explosifs.
En cas de contact d'un réactif avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
3. Les instruments que ne sont pas à jeter doivent être stérilisés après l'emploi, de préférence en autoclave pendant 1 h à 121 °C. Les matériaux à jeter doivent être mis en autoclave ou incinérés.
4. L'acide sulfurique contenu dans la solution d'arrêt et l'acide chlorhydrique utilisé pour laver la verrerie sont corrosifs ; ces substances doivent être utilisées avec prudence. En cas de contact avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
5. Les matériaux liquides à jeter, neutralisés avec une solution alcaline, doivent être désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium en quantité suffisante pour obtenir une concentration finale de 1 % au moins. Une exposition à l'hypochlorite de sodium 1 % pendant 30 minutes suffit pour garantir une désinfection efficace.
6. En cas de renversement accidentel de matériaux potentiellement infectieux, essuyer immédiatement avec du papier absorbant et nettoyer le plan de travail avec, par exemple, de l'hypochlorure de sodium (1 %), avant de continuer le test. En présence d'un acide, on pourra utiliser l'hypochlorite de sodium seulement après avoir essuyé la zone. Tous les matériaux utilisés pour nettoyer un renversement accidentel doivent être éliminés comme étant potentiellement infectieux.

AVERTISSEMENTS ANALYTIQUES

1. Porter tous les réactifs et les échantillons à la température ambiante (18-30 °C) avant l'emploi. Remettre les réactifs à la température de conservation immédiatement après l'emploi. Il est très important de contrôler la température d'incubation des microplaques. Le thermostat ne doit pas descendre au dessous de 35 °C ni au dessus de 39 °C. Ouvrir le sachet contenant les barrettes après l'avoir laissé 30 minutes à la température ambiante.
2. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption. Eviter la contamination microbienne des réactifs parce que la validité peut se réduire et que les résultats peuvent être erronés.
3. Ne pas changer le procédé, ni remplacer les réactifs avec ceux d'autres producteurs ou d'autres lots, à moins qu'il ne soit précisé que le réactif est interchangeable parmi différents lots. Les temps d'incubation ne doivent pas être réduits.
4. Toute la verrerie utilisée pour le test doit être lavée soigneusement avec de l'acide chlorhydrique (2M) et rincée à l'eau distillée ou désionisée.
5. N'exposer les réactifs ni à une forte lumière, ni aux vapeurs d'hypochlorure pendant leur conservation ou pendant les phases d'incubation.
6. Eviter le dessèchement des puits pendant le test.
7. Eviter la contamination croisée entre les réactifs. Il est important d'utiliser des pipettes « dédiées ».
8. Eviter de toucher ou d'éclabousser le bord du puits avec le conjugué. Ne pas souffler sur les microplaques.
9. Les dosages immunoenzymatiques présentent parfois un « effet de bord » (« edge effect ») ; cet effet peut être minimisé en augmentant l'humidité pendant les phases d'incubation. Les microplaques doivent être

- couvertes avec le couvre-plaque et incubées à 37 °C ou au bain-marie. Autrement, on peut faire incuber les plaques dans un analyseur approprié. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO₂.
10. 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.
 11. Des échantillons fortement hémolysés, du sérum non complètement coagulé, ou des échantillons présentant une contamination microbienne peuvent entraîner des résultats erronés.
 12. L'utilisation du kit avec des instruments automatiques doit être validée par l'utilisateur.
 13. Lire attentivement les modes d'emploi des instruments utilisés ; en particulier, il faut prêter attention :
 - à l'installation et aux avertissements spécifiques
 - au principe opérationnel, aux instructions, précautions, risques
 - aux spécifications du producteur et aux performances de l'instrument
 - à la maintenance et à l'assistance technique

7. TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION

Les sérums frais ou décongelés peuvent être utilisés. Les échantillons peuvent être stockés à +2...+8 °C pendant 4 jours.

Pour un stockage plus long, congeler les sérums à – 20 °C. Peut subir jusqu'à un maximum de trois décongelations. Éviter l'utilisation de l'espace de congélateur à dégivrage automatique pour le stockage des échantillons. Les sérums décongelés doivent être bien agités avant l'utilisation. La non-activation à la chaleur peut provoquer des résultats erronés.

Les échantillons qui présentent une contamination microbienne peuvent fausser les résultats. Ceux qui sont fortement lipémiques, ictériques ou contaminés ne doivent pas être utilisés.

L'échantillon ne peut pas se constituer de plasma humain.

8. PROCEDURE

- Préparer le nombre nécessaire de barrettes.
- Préparation de la solution tamponnée de lavage :
Diluer le **tampon de lavage concentré** (par exemple : 25 ml + 225 ml d'eau distillée).

Diluer les échantillons à 1/26, en ajoutant 40 µl de sérum dans 1 ml de diluant. Distribuer 50 µl d'absorbant 50 et 50 µl de chaque échantillon dilué dans les puits (il est conseillé d'effectuer l'analyse en double). Utiliser un puits pour effectuer le blanc, en ajoutant seulement 100 µl de substrat par puits, sans absorbant. Inclure les calibrateurs NON DILUES (100 µl / puits sans l'absorbant), en double de préférence. Couvrir les puits avec la feuille de protection.

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C. Laver pendant 30 secondes (300 µL), répéter la phase de lavage 4 fois. Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits. Couvrir les puits avec la feuille de protection. Incuber pendant 45 minutes à 37 °C. Laver la plaque encore 4 fois comme cela est mentionné précédemment. Distribuer le substrat (100 µl / puits). Incuber 15 minutes à température ambiante. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt. Lire la densité optique à 450 nm ou à 450/620 nm dans les 30 minutes.

9. SCHEMA D'ANALYSE

- | | |
|----------|--|
| 1e ETAPE | <p>Mettre 50 µl d'absorbant G, 50 µl de chaque sérum dilué et 100 µl de calibrateurs dans les puits de la barrette</p> <p>Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.</p> <p>Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl)</p> |
| 2e ETAPE | <p>Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits.</p> <p>Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.</p> <p>Laver pendant 30 seconde à 4 reprises (300 µL)</p> |
| 3e ETAPE | <p>Mettre 100 µl de substrat dans les puits.</p> <p>Incuber pendant 15 minutes à la température ambiante.</p> |
| 4e ETAPE | <p>Ajouter la solution d'arrêt, 100 µl dans chaque puits</p> <p>Lire la densité optique à 450 nm dans les 30 minutes.</p> |

10. VALIDATION DU TEST - CONTROLE QUALITE

Après avoir lu toutes les absorbances (D.O.) à 450 nm, déduire la valeur du blanc-réactif (≤ 0.150) de toutes les autres valeurs.

Le contrôle positif (CALIBRATEUR 3) doit avoir une D.O. ≥ 1.0 . Le rapport des D.O. du contrôle-négatif et du contrôles-seuil doit être $\leq 0,6$.

La D.O. du Contrôle-seuil doit être $\geq 0,2$ à 450 nm et $\geq 0,16$ à 450-620 nm.

11. INTERPRETATION DES RESULTATS

Résultats qualitatifs

Si la D.O. de l'échantillon est supérieure à celle du Contrôle-seuil (CALIBRATEUR 1), l'échantillon est positif pour les IgG anti-VCA.

Calculer le rapport (INDICE) entre la valeur moyenne des D.O. de l'échantillon et celle du contrôle-seuil. L'échantillon sera considéré comme étant :

Positif : Rapport $> 1,2$

Incertain : Rapport = DO du contrôle-seuil. $\pm 20 \%$

Négatif : Rapport < 0.8

Si le résultat est incertain, refaire le test. Si le résultat reste incertain, refaire le test sur un nouveau prélèvement de sang.

Résultats semi-quantitatifs

Les résultats peuvent être exprimés en unités arbitraires (UA), en reportant la D.O. de l'échantillon sur un graphique élaboré avec les 3 calibrateurs et le contrôle négatif (0 AU/ml).

- IMMUNE : quand la concentration des IgG anti-VCA dans l'échantillon est >24 AU/ml

- NON IMMUNE : quand la concentration des IgG anti-VCA est <16 AU/ml

- INCERTAIN : quand la valeur est comprise entre 16 et 24. En cas de résultat incertain, refaire le test. Si le résultat reste incertain, refaire le test sur un nouveau prélèvement de sang.

12. LIMITES DE LA METHODE

Un sérum obtenu pendant la phase aiguë de l'infection, quand seulement les anticorps IgM sont présents, peut être négatif avec cette méthode. Le niveau des IgM anti-VCA doit être déterminé en utilisant le kit Enzywell VCA IgM. Autrement, un deuxième échantillon prélevé 8-14 jours plus tard, devrait être contrôlé en parallèle pour déterminer un incrément des anticorps IgG. Les résultats obtenus servent seulement en tant que support pour le diagnostic et ils doivent être interprétés avec d'autres observations.

Le diagnostic ne doit pas se baser uniquement sur les résultats biologiques, mais il faut tenir compte de l'ensemble des données cliniques.

13. SPECIFICITE ANALYTIQUE

10 échantillons de sérum négatifs vis-à-vis du virus de l'Epstein Barr, contenant des anticorps contre le Cytomégalovirus, Herpes Simplex ou Varicella Zoster, ont été testés.

La présence de ces anticorps n'altère pas le résultat du test.

14. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES

262 échantillons ont été analysés avec le test DIESSE et avec un test disponible dans le commerce. Les résultats sont les suivants :

		Test disponible dans le commerce	
		+	-
DIESSE	+	232	0
	-	6	24

Sensibilité : 97,5 %.

Spécificité : 100 %.

15. PRECISION

Précision dans la série effectuée avec 3 lots différents

Cut-off n=15	Lot 016	Lot 018	Lot 019
O.D.	0.406	0.446	0.552

CV %	10	6	3
-------------	----	---	---

Précision entre séries et entre lots

	INDICE				
Echantillon	Lot 016	Lot 018	Lot 019	Moyen	CV %
1	0.3	0.5	0.4	0.4	25
2	1.7	1.6	1.9	1.7	9
3	2.2	2.9	2.6	2,6	14

16. RESOLUTION DES PROBLEMES

PROBLEME	CAUSES POSSIBLES	ACTION/CONTROLE
Session non valable (tous négatifs)	Absence d'un ou de plusieurs réactifs, ou ajout des réactifs en ordre erroné	Contrôler le processus. Contrôler s'il y a une solution inutilisée. Refaire le test.
	Plaque non réactive	Contrôler le code imprimé sur le sachet de la plaque (lire le mode d'emploi, paragraphe 4).
		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.
	Lavage insuffisant	S'assurer que la pipette fonctionne correctement.
Précision insuffisante	Lavage incomplet des puits	S'assurer que la pipette fonctionne correctement.
	Aspiration insuffisante des puits	S'assurer que la pipette fonctionne correctement.
	Erreur de pipetage	S'assurer que la pipette fonctionne correctement
	Ajout des réactifs trop long	Eviter le dessèchement de la plaque après la phase de lavage. Ajouter immédiatement les réactifs.
	Présence de bulles d'air	Eviter 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 du papier.
Développement insuffisant de la couleur	Temps ou température d'incubation non correct	Vérifier le contrôle de la température et du temps d'incubation
		Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
	Volume incorrect du substrat ajouté à la plaque	Contrôler le fonctionnement de la pipette.

17. BIBLIOGRAPHIE

1. A.Andersson, V. Vetter et él. Avidities of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr Virus serology. J. Med. Virol. 43: 238 (1994).
2. J. Middeldorp and P. Herbrink : Epstein Barr Virus specific marker molecules for early diagnosis of infectious mononucleosis. J. Virol. Methods 21: 133 (1988).
3. C. Valent Sumaya: Serological testing for Epstein Barr Virus - developments in interpretation. J. Inf. Dis. 151: 984 (1985).
4. J. Luka, R.C, Chase and G. Pearson: A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against the major EBV - associated antigens. I. Correlation between ELISA and immunofluorescence titers using purified antigens. J. Immunol. Methods 67:145 (1984).



INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

**ENZYWELL
EPSTEIN BARR VCA IgG**
REF 91055

(PORTUGUÊS)

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

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

2. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

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

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

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

3. PRINCÍPIO DO TESTE

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

O antígeno EBV parcialmente purificado liga-se à fase sólida. As imunoglobulinas específicas são ligadas ao antígeno a seguir à incubação com soro humano diluído.

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

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

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

4. CONTEÚDO DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE

- Os reagentes são suficientes para 96 determinações.
- **Ponha à temperatura ambiente antes da utilização.**

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

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

CONJ CONJUGADO 1 x 16 mL

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

Preparação: pronto a usar.

CAL CALIBRADORES 3 x 1.6 mL

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

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

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

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

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Tetrametilbenzidina a 0,26 mg/mL e peróxido de hidrogénio a 0,01% estabilizado num tampão de citrato a 0,05 mol/L (pH 3,8). Pronto a usar.

SAMP DIL 10 DILUENTE 10 (PF93621) 1x100 mL Para diluição de amostras de soro **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

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

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

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

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

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

A colocar nos poços para diluir as amostras.

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

H₂SO₄ 0.3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602) 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

H₂SO₄ 0,3 mol/L, solução. Pronto a usar.

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

PELÍCULAS ADESIVAS (2).

SACO DE POLIETILENO (1).

MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

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

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DE REAGENTES

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

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

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

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

6. PRECAUÇÕES

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

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

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

Informação de saúde e segurança

1. Não utilize a boca na pipetagem. Utilize luvas descartáveis e protecção para os olhos quando manusear amostras e executar o ensaio. Lave as mãos meticulosamente quando tiver acabado.
2. Os seguintes reagentes contêm baixas concentrações de substâncias nocivas ou irritantes.
 - a) O tampão para enxaguar contém detergentes
 - b) O conjugado e os controlos contêm fenol
 - c) O substracto é ácido
 - d) Os controlos contêm azida de sódio a 0.09% que pode reagir com chumbo e cobre nos canos e formar depósitos altamente explosivos de azidas metálicas.
 Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou olhos, lave a área profusamente com água.
3. Aparelhos não descartáveis devem ser esterilizados após a utilização. O método preferido é a autoclave para 1 hora a 121°C; os descartáveis devem ser colocados em autoclave ou incinerados.
4. O ácido sulfúrico necessário para a solução de paragem e ácido hidrolórico usado na lavagem de recipientes de vidros são corrosivos e devem ser manuseados com cuidado apropriado. Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou olhos, lave a área profusamente com água.
5. Ácidos neutralizados e outros líquidos dispensáveis devem ser descontaminados juntando um volume suficiente de hipoclorito de sódio para obter uma concentração final de pelo menos 1.0%. Uma exposição de 30 minutos a hipoclorito de sódio a 1% pode ser necessária para assegurar uma descontaminação efectiva.
6. Salpicos de materiais potencialmente infecciosos devem ser removidos imediatamente com lenço de papel absorvente e a área contaminada esfregada com hipoclorito de sódio a 1.0%, por exemplo, antes de o trabalho continuar. O hipoclorito de sódio não deve ser usado com salpicos que contenham ácidos, excepto se a área salpicada for primeiro seca. Os materiais usados para limpar salpicos, incluindo as luvas, devem ser descartados como lixo biológico potencialmente perigoso. Não coloque em autoclave materiais que contenham hipoclorito de sódio.

Precauções analíticas

1. Aguarde que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (18-30°C) antes da utilização. **Reponha imediatamente os reagentes à temperatura recomendada para armazenamento após a utilização.** É importante trabalhar à temperatura correcta. Certifique-se de que o termóstato não desce abaixo de 35°C nem sobe acima de 39°C. Abra o saco contendo as tiras pelo menos após 30 minutos à temperatura ambiente.
2. Não utilize os reagentes além do prazo de validade indicado. **A contaminação microbiológica de reagentes deve ser evitada, dado que poderá reduzir a duração do produto e provocar resultados errados.**
3. Não modifique o procedimento de teste ou substitua reagentes por outros de outros fabricantes ou outros lotes de reagente a menos que sejam classificados como intermutáveis. **Não reduza nenhum dos tempos recomendados para incubação.**
4. Qualquer recipiente de vidro a ser usado com os reagentes deve ser devidamente lavado com ácido hidrolórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada de alta qualidade.
5. Não exponha reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.
6. Não deixe que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.
7. Tenha cuidado para que não haja contaminação cruzada entre reagentes. **É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com os vários reagentes.**
8. Tenha cuidado para evitar tocar ou salpicar a borda do poço com o conjugado. **Não “sobre” as microplacas.**
9. Os ensaios de imuno-enzimas podem exibir ocasionalmente um "efeito de margem" que deve ser minimizado aumentando a humidade durante os passos de incubação. **As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas a 37°C num banho de água com um rack ou uma bóia para suportar as placas, se necessário, ou num incubador.** Em alternativa, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Para mais informações, consulte o manual de instruções apropriado. Os incubadores de CO₂ não devem ser utilizados.
10. Certifique-se de que a parte inferior da placa está limpa e seca e que não existem bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa.

11. A utilização de amostras altamente hemolizadas, soros coagulados de forma incompleta ou amostras com contaminação microbiana pode dar origem a resultados erróneos.

12. O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado por o usuário.

13. Para cada instrumento utilizado, leia atentamente o manual de instruções do fabricante para obter informações adicionais sobre os seguintes pontos:

- instalação e requisitos especiais
- princípios de funcionamento, instruções, precauções e riscos
- especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
- manutenção e reparação

7. TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

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

Amostras fortemente lipémicas, contaminadas ou ictéricas devem ser evitadas.

O teste não é aplicável ao plasma humano.

8. PROCEDIMENTO DE TESTE

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

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

Dilua as amostras diluídas na proporção de 1:26 distribuindo 40 µL de soro em 1mL de diluente. Deixe o primeiro poço para o branco que será realizado distribuindo 100 µL da mistura de substrato e apenas 100 µL de solução de paragem. Distribua 100 µL de calibradores/controlo NÃO-DILUÍDOS nos poços designados sem o Sorvente G. O requisito mínimo é 1 controlo negativo, 2 directos e 1 positivo. Distribua 100 µL de Sorvente G e 50 µL de cada amostra diluída por poço (recomendam-se testes duplicados).

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

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

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

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE
--

Deixe o primeiro poço vazio para o branco

- L. Pipete 100 µL de calibradores e controlo Negativo não-diluído nos poços designados
- M. Nos poços subsequentes, pipete 50 µL de Sorvente G e 50 µL de amostras diluídas
- N. Incube durante 45 minutos a 37°C
- O. Lave quatro vezes (300 µL)
- P. Adicione 100 µL de conjugado a cada poço (
- Q. Incube durante 45 minutos a 37°C
- R. Lave quatro vezes (300 µL)
- S. Adicione 100 µL de substrato a cada poço
- T. Incube durante 15 minutos à temperatura ambiente
- U. Adicione 100 µL de solução de paragem
- V. Leia a absorvência a 450 nm ou a 450/620 dentro de 30 min

10. VALIDAÇÃO DO TESTE

Subtraia o valor do branco (que deve ser = 0,150) de todas as outras leituras. O controlo positivo (CALIBRADOR 3) deve ter uma D.O. de ≥ 1.0 . A relação entre Controlo Negativo e Directo deve ser $\leq 0,6$. O valor de D.O. do directo deve ser $\geq 0,2$ a 450 nm e $\geq 0,16$ a 450/620 nm.

11. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

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

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

A amostra é considerada:

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

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

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

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

CÁLCULO SEMIQUANTITATIVO

Unidades arbitrárias (UA)

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

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

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

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

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Uma amostra de soro obtida durante a fase aguda de infecção, quando apenas estão presentes anticorpos IgM, pode revelar-se negativa por este procedimento.

O nível de VCA IgM deve ser determinado usando o kit VCA IgM. Em alternativa, uma segunda amostra de soro obtida 8-14 dias mais tarde deve ser tratada em paralelo para determinar um aumento de nível de anticorpos IgG.

O resultado de teste deve ser usado juntamente com as informações disponíveis na avaliação de outros procedimentos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas dez amostras de soro que estavam negativas para anticorpos do vírus Epstein Barr, que continham Ab contra Citomegalovírus, Herpes Simplex ou Varicela Zoster. Em nenhum caso a presença destes anticorpos mostra reactividade cruzada no teste EBV VCA IgG.

14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

Foram testadas 262 amostras em paralelo com o kit Enzywell e com outro kit comercial. Os resultados podem ser resumidos do seguinte modo:

		REFERÊNCIA	
		+	-
Enzywell	+	232	0
	-	6	24

O método Enzywell mostra uma sensibilidade de 97,5% e uma especificidade de 100%.

15. PRECISÃO

Precisão intra-ensaios efectuada em três lotes diferentes:

Valor directo <i>n=15</i>	Lote 016	Lote 018	Lote 019
D.O.	0,406	0,446	0,552
CV%	10	6	3

Precisões entre testes e entre lotes

Amostra	ÍNDICE DIRECTO			Média	CV%
	Lote 016	Lote 018	Lote 019		
1	0,3	0,5	0,4	0,4	25
2	1,7	1,6	1,9	1,7	9
3	2,2	2,9	2,6	2,6	14

16. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

O cumprimento do procedimento e das especificações do ensaio, bem como uma utilização correcta dos reagentes e

uma pipetagem adequada, podem ajudar a evitar os seguintes erros.

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

17. BIBLIOGRAFIA

1. A. Andersson, V. Vetter et al. Avidities of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr Virus serology. J. Med. Virology 43: 238 (1994).
2. J. Middeldorp and P. Herbrink: Epstein Barr Virus specific marker molecules for early diagnosis of infectious mononucleosis. J. Virol Methods 21: 133 (1988).
3. C. Valent Sumaya: Serological testing for Epstein Barr Virus - developments in interpretation. J. Inf. Dis. 151: 984 (1985).
4. J. Luka, R.C. Chase and G. Pearson: A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against the major EBV-associated antigens. I. Correlation between ELISA and immunofluorescence titers using purified antigens. J. Immunol. Methods 67: 145 (1984).

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



Diesse Diagnostica Senese
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni, Italy
Tel. 0577-587111