

EBNA IgG

**Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for
the quantitative/qualitative
determination of IgG antibodies to
Epstein Barr Virus Nuclear Antigen
in human serum and plasma**

- for "in vitro" diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF EBNG.CE
96 Tests

EBNA IgG

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the quantitative/qualitative determination of IgG antibodies to Epstein Barr Virus Nuclear Antigen in human plasma and sera.
For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

Epstein Barr Virus or EBV is the principal etiological agent of infectious mononucleosis, as well as a contributory factor in the etiology of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma, or NPC. A member of the family Herpesviridae, it has a worldwide distribution, such that 80 to 90% of all adults have been infected. Primary infections usually occur during the first decade of life. While childhood infections are mostly asymptomatic, 50 to 70% of young adults undergoing primary EBV infections show mild to severe illness. EBV may cause a persistent, latent infection which can be reactivated under immunosuppression or in AIDS affected patients. As humoral responses to primary EBV infections are quite rapid, the level and class of antibodies raised in most cases allow classification as to whether the patient is still susceptible, has a current or recent primary infection, had a past infection or may be having reactivated EBV infection. The detection of EBV-specific IgG, IgM and IgA antibodies to its major immunodominant antigens (mainly Nuclear Antigen or EBNA and Viral Capsidic Antigen or VCA) has become therefore an important and useful determination for the monitoring and follow-up of EBV infected patients.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

In order to get rid of crossreactions with other viruses of the same family, microplates are coated with affinity purified native EBNA antigen, capable to provide the assay with the highest specificity.

In the 1st incubation, the solid phase is treated with diluted samples and anti-EBNA IgG are captured, if present, by the antigens.

After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti-EBNA IgG are detected by the addition of anti hIgG antibody, labeled with peroxidase (HRP). The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti EBNA IgG antibodies present in the sample.

IgG in the sample may therefore be quantitated by means of a standard curve calibrated in arbitrary units per milliliter (arbU/ml) as no international standard is available.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: **MICROPLATE**

12 strips x 8 microwells coated with affinity purified native EBNA antigen. Plates are sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

2. Calibration Curve: **CAL N° ..**

Ready to use and color coded standard curve ranging:

4 ml CAL1 = 0 arbU/ml
4 ml CAL2 = 5 arbU/ml
2 ml CAL3 = 10 arbU/ml
2 ml CAL4 = 20 arbU/ml
2ml CAL 5 = 50 arbU/ml
4 ml CAL6 = 100 arbU/ml.

Standards are calibrated against an internal Gold Standard or IGS as no international one is defined.

Contains human serum proteins, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. Standards are blue colored.

3. Control Serum: **CONTROL ...ml**

1 vial. Lyophilized.

It contains fetal bovine serum proteins, human IgG antibodies to EBNA at 20 arbU/ml±20%, 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

3. Wash buffer concentrate: **WASHBUF 20X**

1x60ml/bottle20x concentrated solution.

Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

4. Enzyme conjugate : **CONJ**

1x16ml/vial. Ready to use and red colour coded. It contains Horseradish peroxidase conjugated polyclonal antibodies to human IgG, 5% BSA, 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

5. Chromogen/Substrate: **SUBS TMB**

1x16ml/vial. It contains 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine (or TMB) and 0.02% hydrogen peroxide (or H₂O₂).

Note: To be stored protected from light as sensitive to strong illumination.

6. Sulphuric Acid: **H₂SO₄ 0.3 M**

1x15ml/vial it contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+ P351+P338, P337+P313, P362+P363).

7. Specimen Diluent: **DILSPE**

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

8. Plate sealing foils n°2

9. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (1000, 100 and 10ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (bidistilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator (dry or wet) set at +37°C (+/-0.5°C tolerance).
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for

Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-borne microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
5. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
10. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit did not pointed out any relevant loss of activity up to six 6 uses of the device and up to 3 months.
11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..
14. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water
16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.

3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.

5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

6. Samples whose anti-EBNA IgG antibody concentration is expected to be higher than 100 arbU/ml should be diluted before use, either 1:10 or 1:100 in the Calibrator 0 arbU/ml. Dilutions have to be done in clean disposable tubes by diluting 50 ul of each specimen with 450 ul of Cal 0 (1:10). Then 50 ul of the 1:10 dilution are diluted with 450 ul of the Cal 0 (1:100). Mix tubes thoroughly on vortex and then proceed toward the dilution step reported in section M.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of storing.

In this case call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back inside the aluminum pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°..8°C.

Important Note: After first opening, remaining strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

Calibration Curve

Ready to use component. Mix carefully on vortex before use.

Control Serum

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilised powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex.

Note: The control after dissolution is not stable. Store frozen in aliquots at -20°C.

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

Sample Diluent

Ready to use component. Mix carefully on vortex before use.

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/-0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).
5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.
An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of $\pm 5\%$.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0 ; (c) linearity to ≥ 2.0 ; repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well

identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.

6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Validation of Test" and "Assay Performances". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dissolve the content of the Control Serum as reported.
6. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
7. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
8. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
9. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
10. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
11. Check that the micropipettes are set to the required volume.
12. Check that all the other equipment is available and ready to use.
13. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing.

The kit may be used for quantitative and qualitative determinations as well.

M1. QUANTITATIVE DETERMINATION:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the A1 and B1 empty for the operation of blanking.
3. Dispense 100 µl of Calibrators and 100 µl Control Serum in duplicate. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
4. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

5. Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section I.3).
6. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except A1+B1 blanking wells, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1 and B1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

7. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
8. Wash microwells as in step 5.
9. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank wells A1 and B1 included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

10. Pipette 100 µl Sulphuric Acid to stop the enzymatic reaction into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
11. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1 or B1 or both.

M2. QUALITATIVE DETERMINATION

If only a qualitative determination is required, proceed as described below:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.
3. Dispense 100 µl of Calibrator 0 arbU/ml and Calibrator 10 arbU/ml in duplicate and Calibrator 100 arbU/ml in single. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
4. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

5. Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section I.3).

6. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the A1 well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

7. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
8. Wash microwells as in step 5.
9. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

10. Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
11. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

1. Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.
2. Reading has to be carried out just after the addition of the Stop Solution and anyway not any longer than 20 minutes after its addition. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to high background.

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Calibrators & Control(*)	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm/620-630nm

(*) Important Notes:

- The Control Serum (CS) it does not affect the test's results calculation.
- The Control Serum (CS) used only if a laboratory internal quality control is required by the Management.

An example of dispensation scheme for Quantitative Analysis is reported below:

		Microplate											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S 1										
B	BLK	CAL4	S 2										
C	CAL1	CAL5	S 3										
D	CAL1	CAL5	S 4										
E	CAL2	CAL6	S 5										
F	CAL2	CAL6	S 6										
G	CAL3	CS(*)	S 7										
H	CAL3	CS(*)	S 8										

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrator
S = Sample CS(*)= Control Serum - Not mandatory

An example of dispensation scheme in qualitative assays is reported below:

		Microplate											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S3	S11										
B	CAL1	S4	S12										
C	CAL1	S5	S13										
D	CAL3	S6	S14										
E	CAL3	S7	S15										
F	CAL6	S8	S16										
G	S1	S9	S17										
H	S2	S10	S18										

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrators
S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the calibrators any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as qualified.

Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
CAL 1 0 arbU/ml	< 0.150 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
CAL 2 5 arbU/ml	OD450nm > OD450nm CAL1 + 0.100
CAL 3 10 arbU/ml	OD450nm > OD450nm CAL1 + 0.200
CAL 6 100 arbU/ml	OD450nm > 1.000

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.

If they do not, do not proceed any further and operate as follows:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Sustrate solution has not got contaminated during the assay
CAL 1 0 arbU/ml > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use;

variation > 30%	3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive calibrator instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative calibrator or of their wells has occurred due spills of positive samples or the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
CAL 2 5 arbU/ml OD450nm < OD450nm CAL1 + 0.100	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (ex.: dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
CAL 3 10 arbU/ml OD450nm < OD450nm CAL1 + 0.200	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (ex.: dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
CAL 6 100 arbU/ml < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead) ; 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

** Note:

If Control Serum has used, verify the following data:

Check	Requirements
Control Serum	Mean OD450nm CAL4 +/-20%

If the results of the test doesn't match the requirements stated above, operate as follows:

Problem	Check
Control Serum Different from Expected value	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the control has occurred.

Anyway, if all other parameters (Blank, CAL1, CAL2, CAL 6), match the established requirements, the test may be considered valid.

Important note:

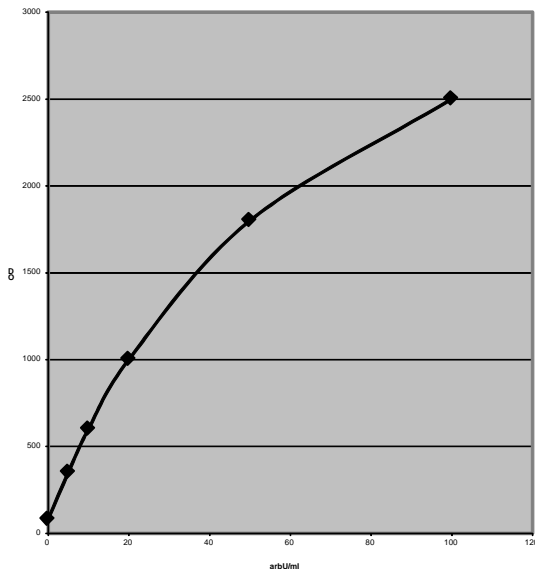
The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 11.

P. RESULTS

P.1 Quantitative method

If the test turns out to be valid, use for the quantitative method an approved curve fitting program to draw the calibration curve from the values obtained by reading at 450nm/620-630nm (4-parameters interpolation is suggested). Then on the calibration curve calculate the concentration of anti EBNA IgG antibody in samples.

An example of Calibration curve is reported below.



Important Note:

Do not use the calibration curve above to make calculations.

P.2 Qualitative method

In the qualitative method, calculate the mean OD450nm/620-630nm values for the Calibrators 0 and 10 arbU/ml and then check that the assay is valid.

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 11):

Note: *The following data must not be used instead or real figures obtained by the user.*

Calibrator 0 arbU/ml: 0.020 – 0.024 OD450nm
 Mean Value: 0.022 OD450nm
 Lower than 0.150 – Accepted

Calibrator 10 arbU/ml: 0.450 – 0.470 OD450nm
 Mean Value: 0.460 OD450nm
 Higher than Cal 0 + 0.200 – Accepted

Calibrator 100 arbU/ml: 2.045 OD450nm
 Higher than 1.000 – Accepted

The OD450nm/620-630nm of the Calibrator 10 arbU/ml is considered the cut-off (or Co) of the system.

The ratio between the OD450nm/620-630nm value of the sample and the OD450nm/620-630nm of the Calibrator 10 arbU/ml (or S/Co) can provide a semi-quantitative estimation of the content of specific IgG in the sample.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Samples with a concentration lower than 5 arbU/ml are considered negative for anti EBNA IgG antibody.

Samples with a concentration ranging 5-10 arbU/ml are considered in the gray-zone. Samples with a concentration higher than 10 arbU/ml are considered positive for anti EBNA IgG antibody.

EBNA IgG results alone are not, anyway, enough to provide a clear diagnosis of EBV infection. At least EBV VCA IgM results are necessary in combination.

A reference range of the minimum essential serological markers of Epstein-Barr infection, derived from Infectious Diseases Handbook, 3rd edition, published by Lexi-Comp Inc., USA, is reported schematically below:

VCA IgM	EBNA IgG	Interpretation
negative	negative	No history of EBV infection
positive	negative	Acute primary infection
negative	positive	History of previous infection
positive	positive	Reactivation

Important notes:

- Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.*
- When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.*
- Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.*

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted in an external clinical center on negative and positive samples with reference to a FDA approved commercial kit.

1. Limit of detection

No international standard for EBNA IgG Antibody detection has been defined so far by the European Community.

In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient with an history of past mononucleosis infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The method is based on the use of an affinity purified native EBNA antigen to provide the assay with the highest specificity to EBV.

The diagnostic performances were evaluated in a performance evaluation study conducted in an external centre, with excellent experience in the diagnosis of infectious diseases and in particular in EBV infection.

The Diagnostic Sensitivity was studied on more than 50 samples, pre-tested positive with two reference kits of European origin in use at the laboratory. Positive samples were collected from patients that experienced mononucleosis infection.

The diagnostic specificity was determined on panels of more than 50 negative samples from normal individuals and blood

donors, classified negative with the reference kit, including potentially interfering specimens.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the specificity.

No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed.

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

The Performance Evaluation provided the following values :

Sensitivity	≥ 98 %
Specificity	≥ 98 %

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System in compliance with ISO 13485 rule. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:
 Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.
 Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italy



3. Reproducibility:

Data obtained from a study conducted on three samples of different EBNA IgG reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs show CV% values ranging 5-20% depending on OD450nm/620-630nm readings.

The variability shown in the tables did not result in sample misclassification.

S. LIMITATIONS

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates may generate false positive results.

Depending on the reference kit in use, due to some heterogeneity among different devices, the presence of 2-5% false reactivity may be seen.

REFERENCES

1. Engvall E. and Perlmann P. J.Immunochemistry 1971 : 8, 871-874.
2. Engvall E. and Perlmann P. J.Immunol. 1971 : 109, 129-135.
3. Remington J.S. and Klein J.O. In "Infectious diseases of the fetus and newborn infant". (1966) Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
4. Volk W.A. In "Essential of Medical Microbiology". (1982) Second edition pp 729. G.B.Lippincott Co., Philadelphia, New York, S.José, Toronto.
5. Davidsohn I. and Lee C.L. In "The clinical serology of infectious mononucleosis" Infectious mononucleosis (1969). Carter R.L. and Pnman H.G. Edrs, Oxford, Blackwell Scientific Publications, pp 177-200.
6. Evans A.S. et al. N.Engl.J.Med. 1968 : 278, 1121-1127.
7. Henle G. et al. Int.J.Cancer. 1976 : 17, 1-7.
8. Henle G. et al.. J.Infect.Dis.. 1974 : 130, 231-239.
9. Henle G. et al.. Cancer. 1974 : 34, 1368-1374
10. Miller G. et al.. Prog.Med.Virol. 1975 : 20, 84-112.

EBNA IgG

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa/cuantitativa de anticuerpos IgG al Antígeno Nuclear del Virus Epstein Barr en plasma y suero humanos

- Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro"-



DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF EBNG.CE
96 pruebas

EBNA IgG

A. OBJETIVO DEL ESTUCHE.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa/cuantitativa de anticuerpos IgG al Antígeno Nuclear del Virus Epstein Barr (EBNA), en plasma y suero humanos. Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN.

El Virus Epstein Barr (EBV) es considerado el principal agente etiológico de la Mononucleosis Infecciosa, así como del Linfoma de Burkitt y del Carcinoma Nasofaríngeo. Perteneció a la familia *Herpesviridae* y está ampliamente distribuido en el mundo, se estima que entre un 80 y un 90% de los adultos esté infectado con el virus. Las infecciones primarias ocurren generalmente en la primera década de vida. Mientras en la infancia son en su mayoría asintomáticas, el 50-70% de los adultos jóvenes con infecciones primarias puede desarrollar de formas leves a severas de la enfermedad.

EBV causa infecciones latentes que pueden reactivarse en condiciones de inmunodepresión (personas inmunocomprometidas o pacientes SIDA). Debido a que la respuesta humoral a la infección primaria por EBV es bastante rápida, los niveles de anticuerpos presentes, así como la clase de los mismos, permiten determinar si un paciente es susceptible, si presenta una infección primaria reciente, en curso, o si está ocurriendo una reactivación de la infección por EBV.

La detección de anticuerpos IgG, IgM e IgA específicos contra los principales antígenos inmunodominantes del virus (Antígeno Nuclear o EBNA y Antígeno Capsídico Viral o VCA), constituye una herramienta importante tanto para el monitoreo de pacientes infectados por EBV como para los estudios epidemiológicos.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

Con la finalidad de reducir reacciones cruzadas con otros virus de la misma familia las microplacas están recubiertas con antígeno nativo EBNA purificado por afinidad, en grado de garantizar una alta especificidad.

En la primera incubación, se adicionan las muestras diluidas y si están presentes en las mismas los anticuerpos IgG anti-EBNA, quedan capturados por los antígenos de la fase sólida. Luego del lavado que elimina el resto de los componentes de la muestra, en la segunda incubación los anticuerpos IgG anti-EBNA inmovilizados en la fase sólida son detectados mediante un anticuerpo anti-IgG humana marcado con peroxidasa (HRP). Posteriormente se añade la mezcla cromógeno/substrato, la cual se combina con la enzima conjugada unida a la fase sólida, dando lugar a una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG anti-EBNA presentes en la muestra, la misma es detectable mediante un lector ELISA.

La cuantificación de los anticuerpos IgG presentes en la muestra se realiza mediante una curva estándar calibrada en unidades arbitrarias por mililitro (arbU/ml), ya que no hay disponible hasta el momento ningún estándar internacional.

D. COMPONENTES.

Cada estuche contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: **MICROPLATE**

12 tiras x 8 pocillos intercambiables recubiertos antígeno nativo EBNA purificado por afinidad. Las microplacas están almacenadas en bolsas selladas con desecante y deben ser puestas a temperatura ambiente antes de abrirlas, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y almacenar a 4°C.

2. Curva de Calibración: **CAL N° ...**

Listo para el uso. Curva estándar con código de color:

4 ml CAL1 = 0 arbU/ml
4 ml CAL2 = 5 arbU/ml
2 ml CAL3 = 10 arbU/ml
2 ml CAL4 = 20 arbU/ml
2 ml CAL5 = 50 arbU/ml
4 ml CAL6 = 100 arbU/ml.

Los estándares han sido calibrados contra un Gold Standard interno (IGS), ya que no se ha definido uno internacional. Contiene proteínas del suero humano, 2% de caseína, tampón citrato de sodio 10 mM pH 6+/-0.1, 0.1% de Tween 20, así como azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como preservativos. La Curva de Calibración está codificada con el color azul.

3. Suero Control: **CONTROL ...ml**

1 vial. Liofilizado.

Contiene suero fetal bovino, anticuerpos IgG humanos anti-EBNA a 20 ±20% arbU/ml, 0.2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 0.045% como preservativos.

4. Tampón de Lavado Concentrado: **WASHBUF 20X**

1x60ml/botella. Solución concentrada 20x.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0+/- 0.2, Tween 20 al 0.05% y ProClin 300 al 0.045%

5. Conjugado: **CONJ**

1x16ml/vial. Listo para el uso, codificado con el color rojo. Contiene anticuerpos policlonales anti-IgG humanos marcados con peroxidasa (HRP), tampón Tris 10 mM pH 6.8+/-0.1, BSA 5%, además de sulfato de gentamicina 0.02 % y ProClin 300 0.045% como preservativos.

6. Cromógeno/Substrato : **SUBS TMB**

1x16ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato-fosfato 50mM pH 3.5-3.8, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02% así como dimetilsulfóxido 4%.

Nota: Evitar la exposición a la luz, la sustancia es fotosensible.

7. Ácido Sulfúrico: **H2SO4 0.3 M**

1x15ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0.3M

Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

8. Diluyente de muestras : **DILSPE**

2x60ml/vial. Solución tamponada proteica para la dilución de las muestras. Contiene 2% de caseína, tampón citrato de sodio a pH 6.0 +/- 0.1, 0.1% de Tween 20, además de azida sódica al 0.09% y 0.045% de ProClin 300 como preservativos.

9. Sellador adhesivo, n° 2

10. Manual de instrucciones, n° 1

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (1000, 100 y 10ul) y puntas plásticas desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. *Timer* con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) fijo a 37°C.
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El estuche debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión del especialista responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar las ropas protectoras adecuadas de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los estuches, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del substrato a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el estuche a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar reactivos de diferentes lotes ni tampoco de diferentes estuches.
7. Comprobar que los reactivos no contienen precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al supervisor para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el estuche.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas luego de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del estuche usando puntas desechables y cambiándolas luego de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en el estuche e internamente en los reactivos. Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en estuches abiertos, en uso por un período de hasta 3 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.
13. Los desechos producidos durante el uso del estuche deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del estuche (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales

de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Las muestras deben estar identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Se recomienda el uso del código de barras.
3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.
6. Aquellas muestras donde la concentración de anticuerpos IgG anti-EBNA se sospeche mayor de 100 arbU/ml, deben ser diluidas 1:10 ó 1:100 en el Calibrador 0 arbU/ml. Las diluciones se recomienda hacerlas en un tubo desechable: 50 ul de la muestra + 450 ul del Cal 0 (1:10), luego 50 ul de la dilución 1:10 se diluye en 450 ul del Cal 0 (1:100). Agitar los tubos con ayuda del vórtex y proceder al paso de dilución según la sección M.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de conservación. De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas, deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C.

Nota importante: Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes, se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie de amarillo a verde.

Curva de Calibración:

Listo para el uso. Mezclar bien con la ayuda de un vórtex, antes de usar.

Suero Control:

Añadir al polvo liofilizado, el volumen de agua de calidad ELISA indicado en la etiqueta. Dejar disolver completamente y luego mezclar cuidadosamente con el vórtex antes de usar.

Nota: Una vez reconstituida, la solución no es estable. Se recomienda mantenerla congelada en alícuotas a -20°C.

Solución de Lavado Concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada debe diluirse 20x con agua bidestilada y mezclarse suavemente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

Conjugado:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Diluyente de muestras :

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Cromógeno/ Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Ácido Sulfúrico:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Leyenda:

Indicación de peligro, Frases H

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, Frases P

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL ESTUCHE.

- Las micropipetas deben ser calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (etanol 70%, lejía 10%, de calidad de los desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%.
- La incubadora de ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
- El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar

que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.

- Los tiempos de incubación deben tener un margen de $\pm 5\%$.
- El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro de 620-630nm, obligatorio para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda ≤ 10 b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2.0 , c) Linealidad ≥ 2.0 , reproducibilidad $\geq 1\%$. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar la correcta medición de la densidad óptica, según las normas del fabricante.
- En caso de usar un sistema automatizado de ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control de calidad interno". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y las de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos por contaminación de los pocillos adyacentes por muestras fuertemente reactivas. Se recomienda el uso de sistemas automatizados para el pesquijaje en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.
- El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el estuche, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

- Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del estuche (envase primario). No usar si ha caducado.
- Compruebe que los componentes líquidos no están contaminados con partículas o agregados visibles.
- Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico.
- Compruebe que no han ocurrido rupturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
- Disolver el Suero Control como se ha descrito anteriormente y mezclar suavemente.
- Diluir totalmente la Solución de Lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
- Dejar los componentes restantes alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.

8. Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y cebar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
9. Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
10. En caso de trabajar automáticamente, encender el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
11. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
12. Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
13. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al supervisor.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

El estuche puede ser utilizado tanto para la determinación cualitativa como cuantitativa.

M.1 Determinación Cuantitativa.

1. Diluir las muestras **1:101** dispensando en un tubo desechable 1 ml de Diluyente de Muestras y 10 µl de muestra, mezclar con ayuda de un vórtex, antes de usar. No diluir los Calibradores ya que están listos para el uso.
2. Poner el número necesario de tiras en el soporte plástico e identificar los pocillos de las muestras y de los estándares. Dejar los pocillos A1 y B1 vacíos para el blanco.
3. Dispensar 100µl de los Calibradores y 100µl del Suero Control por duplicado, luego dispensar 100µl de las muestras diluidas.
4. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.

Nota importante: Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado solo cuando se hace la prueba manualmente. No sellar cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.

5. Luego de la primera incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
6. Dispensar 100µl de Conjugado en todos los pocillos, excepto A1 y B1, controlar que los reactivos han sido correctamente añadidos.

Nota importante: Tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta al dispensar el Complejo. Podría producirse contaminación.

7. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.
8. Lavar la microplaca, de igual forma que en el paso 5.
9. Dispensar 100µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluidos A1 y B1. Incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

10. Dispensar 100µl de Ácido Sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 9. Los pocillos correspondientes a las muestras positivas, el Suero Control y los Calibradores positivos deben cambiar de color azul a amarillo.
11. Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y, otro de 620-630 nm (substracción del fondo obligatorio), calibrando el instrumento con los pocillos A1 y B1 (blanco).

M.2 Análisis Cualitativo.

Para realizar la determinación cuantitativa, proseguir como se indica a continuación:

1. Diluir las muestras **1:101** dispensando en un tubo desechable (ej: 1 ml de Diluyente de Muestras y 10 µl de muestra), mezclar con ayuda de un vórtex, antes de usar. No diluir los Calibradores ya que están listos para el uso. Mezclar con ayuda de un vórtex.
2. Poner el número necesario de tiras en el soporte plástico e identificar los pocillos de las muestras y de los estándares. Dejar el pocillo A1 vacío para el blanco.
3. Dispensar 100 µl del Calibrador 0 arbU/ml por duplicado, 100 µl del Calibrador 10 arbU/ml por duplicado, 100 µl del Calibrador 100 arbU/ml, en simple. Dispensar 100 µl de las muestras en los pocillos correspondientes.
4. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.

Nota importante: Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado solo cuando se hace la prueba manualmente. No sellar cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.

5. Luego de la primera incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
6. Dispensar 100µl de Conjugado en todos los pocillos, excepto A1.

Nota importante: Tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta al dispensar el conjugado. Podría producirse contaminación.

7. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.
8. Luego de la segunda incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
9. Dispensar 100µl de Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1. Incubar la microplaca, protegida de la luz, durante **20 minutos a temperatura ambiente (18-24°C)**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

10. Dispensar 100µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 9. Los pocillos correspondientes a las muestras positivas, el Suero Control y los Calibradores positivos deben cambiar de color azul a amarillo.
11. Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1.

Notas generales importantes:

1. Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO

Método	Operaciones
Calibradores & Control(*)	100 ul
Muestras diluidas 1:101	100 ul
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20''de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado	100 ul
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20''de remojo o 6 ciclos sin remojo
Mezcla TMB/H2O2	100 ul
3ª incubación	20 min
Temperatura	t.a.°
Acido Sulfúrico	100 ul
Lectura D.O.	450nm/620-630 nm

t.a.° = temperatura ambiente

(*) Notas importantes:

- El suero de control (CS) no afecta al cálculo de los resultados de la prueba.
- El suero de control (CS) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado en el análisis cuantitativo:

Microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	CAL4	M1									
B	BL	CAL4	M2									
C	CAL1	CAL5	M 3									
D	CAL1	CAL5	M 4									
E	CAL2	CAL6	M 5									
F	CAL2	CAL6	M 6									
G	CAL3	SC(*)	M 7									
H	CAL3	SC(*)	M 8									

Leyenda: BL = Blanco // CAL = Calibradores // SC(*)= Suero Control - No obligatorio // M = Muestra

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado en el análisis cualitativo:

Microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M3	M11									
B	CAL1	M4	M12									
C	CAL1	M5	M13									
D	CAL3	M6	M14									
E	CAL3	M7	M15									
F	CAL6	M8	M16									
G	M1	M9	M17									
H	M2	M10	M18									

Leyenda: BL = Blanco // CAL = Calibradores // M = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza un grupo de pruebas con los calibradores cada vez que se usa el estuche para verificar si el procedimiento durante el ensayo se ha realizado correctamente.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Exigencia
Pocillo Blanco	< 0.100DO450nm
CAL 1 0 arbU/ml	< 0.150 DO450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación < 30%< 30%
CAL 2 5 arbU/ml	DO450nm >DO450nm CAL1 + 0.100
CAL 3 10 arbU/ml	DO450nm >DO450nm CAL1 + 0.200
CAL 6 100 arbU/ml	DO450nm > 1.000

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pase a la siguiente sección.

En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe:

Problema	Compruebe que
Pocillo blanco > 0.100 DO450nm	la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
CAL 1 0 arbU/ml > 0.150 OD450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación > 30%	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido cebado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores durante el dispensado de los calibradores. 4. no ha existido contaminación del Calibrador negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el Conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.

CAL 2 5 arbU/ml DO450nm <DO450nm CAL1 + 0.100	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el calibrador equivocado). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
CAL 3 10 arbU/ml DO450nm <DO450nm CAL1 + 0.200	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución. 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
CAL 6 100 arbU/ml < 1.000DO450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar una muestra equivocada). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.

Si se presenta alguno de los problemas anteriores, avisar al supervisor para tomar las medidas pertinentes.

**** Notas**

Si se ha usado suero de control, comprobar los siguientes datos:

Parámetro	Exigencia
Suero Control	valor medio de DO450nm CAL4 +/-20%

Si los resultados de la prueba no se corresponden con los requisitos indicados anteriormente, proceder del siguiente modo:

Problema	Compruebe que
Suero Control Diferente de establecidos	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar una muestra equivocada). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del suero.

En cualquier caso, si todos los demás parámetros (blanco, CAL1, CAL2, CAL3, CAL6) se corresponden con los requisitos establecidos, la prueba puede considerarse válida.

Nota importante:

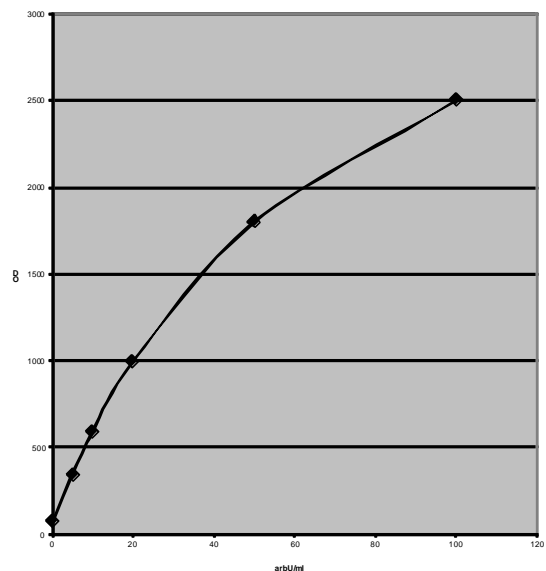
El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11.

P. RESULTADOS.

P.1 Método cuantitativo.

Si el ensayo resulta válido, usar para el método cuantitativo un programa de ajuste de curva para diseñar la curva de calibración con los valores obtenidos en la lectura a 450nm/620-630nm (se sugiere interpolar 4 parámetros). Luego calcular sobre la curva de calibración la concentración de anticuerpos IgG anti-EBNA presentes en la muestra.

A continuación, un ejemplo de curva de calibración:



Nota Importante:

No usar la curva anterior para formular los cálculos.

P.2 Método cualitativo.

En el método cualitativo, calcular los valores medios de DO450nm/620-630nm para los Calibradores 0 y 10 arbU/ml, luego comprobar que el ensayo es válido.

A continuación, un ejemplo de los cálculos a realizar (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11).

Los siguientes datos no deben usarse en lugar de los valores reales obtenidos en el laboratorio

Calibrador 0 arbU/ml: 0.020 – 0.024 DO450nm
 Valor medio: 0.022 DO450nm
 Menor de 0.150 – Válido
 Calibrador 10 arbU/ml: 0.450 – 0.470 DO450nm
 Valor medio: 0.460 DO450nm
 Mayor de Cal 0 + 0.200 – Válido
 Calibrador 100 arbU/ml: 2.045 DO450nm
 Mayor de 1.000 – Válido

La DO450nm/620-630nm del Calibrador 10 arbU/ml se considera el cut-off (Co) del sistema.

La relación entre los valores de DO450nm/620-630nm de las muestras y los valores de DO450nm/620-630nm del Calibrador 10 arbU/ml (S/Co) permiten un estimado semicuantitativo de la cantidad de IgG contenida en la muestra.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Las muestras con una concentración menor de 5 arbU/ml se consideran negativas a IgG anti-EBNA EBV.

Las muestras con una concentración entre 5-10 arbU/ml se consideran en la zona gris, mientras que aquellas con una concentración mayor de 10 arbU/ml se consideran positivas a IgG anti-EBNA EBV.

Los resultados de esta prueba EBNA IgG, por si solos no son suficientes para establecer un diagnóstico efectivo. Es necesario combinarlos a la detección de IgM anti-VCA.

A continuación se muestra un esquema con los marcadores serológicos esenciales de la infección por Epstein-Barr (Infectious Diseases Handbook, 3ª ed. Lexi-Comp Inc., USA).

VCA IgM	EBNA IgG	Interpretación
negativo	negativo	No historia de infección por EBV
positivo	negativo	Infección primaria aguda
negativo	positivo	Historia de infección previa
positivo	positivo	Reactivación

Notas generales importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del supervisor del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
3. El diagnóstico debe ser evaluado y comunicado al paciente por un médico calificado.

R. PERFORMANCES.

La evaluación del performance ha sido realizada en un centro clínico externo, con vasta experiencia en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Han sido utilizados paneles con muestras negativas y positivas con referencia a un estuche comercial aprobado por FDA.

1. Límite de detección:

La Comunidad Europea no ha definido hasta el momento ningún estándar internacional para la detección de anticuerpos IgG anti-EBNA del EBV.

Para garantizar una sensibilidad óptima al sistema, ha sido preparado un Gold Standard Interno (IGS), derivado de un paciente en fase aguda de mononucleosis.

2. Sensibilidad y especificidad Diagnósticas:

Las microplacas están recubiertas con antígeno nativo EBNA purificado por afinidad, en grado de garantizar una alta especificidad.

La sensibilidad diagnóstica ha sido estudiada en más de 50 muestras, clasificadas como positivas mediante un estuche europeo de referencia. Las muestras positivas provienen de pacientes con la mononucleosis.

La especificidad diagnóstica ha sido determinada utilizando paneles con más de 50 muestras negativas provenientes de individuos sanos y donantes de sangre, clasificadas como negativas según el estuche de referencia. Lo mismo es válido para las muestras potencialmente interferentes.

Se emplearon además plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrato, EDTA y heparina) y suero humanos. No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

Las muestras congeladas han sido probadas para comprobar si la congelación interfiere con el procedimiento del ensayo. No se ha observado interferencia a partir de muestras limpias y libres de agregados.

La evaluación del performance arrojó los siguientes valores:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	≥ 98 %

3. Reproducibilidad:

Se realizó un estudio con 3 muestras de reactividades a IgG anti-EBNA diferentes, examinadas en 16 réplicas, en tres corridas separadas, se obtuvo un CV de 5 a 20%, en dependencia de las lecturas de DO450nm/620-630nm.

La variabilidad mostrada en las tablas no dió como resultado una clasificación errónea de las muestras.

S. LIMITACIONES.

Los falsos positivos fueron estimados como 2-5% de la población normal.

Las muestras que luego de ser descongeladas presentan partículas de fibrina o partículas agregadas, generan algunos resultados falsos positivos.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Engvall E. and Perlmann P. J.Immunochemistry 1971 : 8, 871-874.
2. Engvall E. and Perlmann P. J.Immunol. 1971 : 109, 129-135.
3. Remington J.S. and Klein J.O. In "Infectious diseases of the fetus and newborn infant". (1966) Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
4. Volk W.A. In "Essential of Medical Microbiology". (1982) Second edition pp 729. G.B.Lippincott Co., Philadelphia, New York, S.Josè, Toronto.
5. Davidsohn I. and Lee C.L. In "The clinical serology of infectious mononucleosis" Infectious mononucleosis (1969). Carter R.L. and Pnman H.G. Edrs, Oxford, Blackwell Scientific Publications, pp 177-200.
6. Evans A.S. et al. N.Engl.J.Med. 1968 : 278, 1121-1127.
7. Henle G. et al. Int.J.Cancer. 1976 : 17, 1-7.
8. Henle G. et al.. J.Infect.Dis.. 1974 : 130, 231-239.
9. Henle G. et al.. Cancer. 1974 : 34, 1368-1374
10. Miller G. et al.. Prog.Med.Virol. 1975 : 20, 84-112.

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado conforme a la norma ISO 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni
Milán – Italia



