

VCA IgM

**“Capture” Enzyme ImmunoAssay
(ELISA) for the quantitative/qualitative
determination of IgM class antibodies to
Epstein Barr Virus Capsidic Antigen
in human plasma and sera**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl

Via Carducci n° 27

20099 – Sesto San Giovanni

Milano – Italy

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF VCAM.CE
96 Tests

VCA IgM

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the quantitative or qualitative determination of IgM class antibodies to Epstein Barr Virus (EBV) Capsidic Antigen in human plasma and sera with the "capture" system.

The kit is intended for the classification of the viral infective agent and the follow-up of EBV infected patients.

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 has become therefore an important and useful determination for the monitoring and follow-up of EBV infected patients.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

The assay is based on the "IgM Capture" method and on affinity purified native VCA antigen.

Microplates are coated with a polyclonal anti-IgM antibody that in the 1st incubation "captures" specifically this class of antibodies.

After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti EBV-VCA IgM are detected by the addition of a complex formed by biotinylated affinity purified native VCA antigen and Streptavidine, labelled 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 IgM antibodies present in the sample and can be detected by an ELISA reader.

Quantification of IgM is made possible by a standard curve calibrated in arbitrary units, in absence of an international standard to refer to.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to carry out 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 breakable wells coated with affinity-purified anti human IgM specific (u-chain) goat polyclonal antibody and 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 = 10 arbU/ml

2 ml CAL3 = 20 arbU/ml

2 ml CAL4 = 50 arbU/ml

4 ml CAL5 = 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. Contains fetal bovine serum proteins, human anti EBV VCA IgM antibodies at 20 ± 20% arbU/ml, 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

Important Note: The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label .

3. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle. 20x 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 20X

1x0.8 ml/vial. 20x concentrated solution. It contains peroxidase (HRP) labeled Streptavidine, dissolved into a buffered solution of 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 5% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

5. Antigen Diluent : AG DIL

n° 1 vial of 16 ml. Protein buffer solution for the preparation of the working EBV VC antigen. The solution contains 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.2 mg/ml gentamicine sulphate as preservatives. The reagent is code coloured with 0.01% red alimentary dye

6. EBV VCA Antigen : Ag VCA

1x6 vials. Lyophilized reagent to be dissolved with 1.9 ml of Antigen Diluent as reported in the proper section. It contains biotinylated affinity purified native VCA antigen, 25 mM Tris buffer pH 7.8+/-0.1 and 5% BSA as proteic carrier.

7. Specimen Diluent: DILSPE

2x60.0 ml/vial. Buffered solution for the dilution of samples. It contains 2% casein, 0.2 M Tris buffer pH 6.0+/-0.1, 0.2% Tween 20, 0.045% ProClin 300 and 0.09% sodium azide as preservatives. The component is blue color coded.

8. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

1x16ml/vial. Contains a 50 mM citrate-phosphate buffered solution at pH 3.5-3.8, 0.03% tetra-methyl-benzidine or TMB and 0.02% hydrogen peroxide of H₂O₂.

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

9. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vial. Contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

10. Plate sealing foils n° 2

11. Package insert n° 1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes in the range 10-1000 ul and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (double distilled 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.
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and if with 620-630nm (blinking) 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/Substrate (TMB/H₂O₂) 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.
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 external (primary container) and internal (vials) labels.
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 labware is recommended in the preparation of the washing solution or in transferring components into other containers of automated workstations, in order to avoid 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. 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 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 RECOMMANDATIONS

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. Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate.
3. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
4. 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.
5. 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.
6. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8µ filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-uses of the device and up to 3 months.

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant has not turned dark green, indicating a defect in 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. Mix well on vortex before use.

Control Serum:

Lyophilized reagent to be dissolved with EIA grade water as reported in the label.

Note: In order to maintain its reactivity fully preserved, upon dissolution keep the excess frozen in aliquots at -20°C and use just once. Do not freeze again.

Wash buffer concentrate:

The whole content of the 20x concentrated solution has to be diluted with bidistilled water up to 1200 ml 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.

Antigen-Conjugate Complex:

Proceed carefully as follows:

1. Dissolve the content of a lyophilized vial with 1.9 ml of Antigen Diluent. Let fully dissolved the lyophilized content and then gently mix on vortex.
2. Gently mix the concentrated Enzyme Conjugate on vortex. Then add 0.1 ml of it to the vial of the dissolved EBV VC Ag and mix gently on vortex.

Important Notes:

1. *Dissolve and prepare only the number of vials necessary to the test. The complex obtained is not stable. Store any residual solution frozen in aliquots at -20°C.*
2. *The preparation of the complex has to be done **right before** the dispensation of samples and controls into the plate. Mix again on vortex gently just before its use.*

Specimen Diluent

Ready to use. Mix on vortex before use.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. Do not expose to strong light, oxidizing agents and metallic surfaces.

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

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 (70% ethanol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample or the components of the kit. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of $\pm 2\%$.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of $\pm 0.5^\circ\text{C}$) 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, shaking, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section "Internal Quality Control". 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 samples and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells due to strongly reactive samples, leading to false positive results. The use of ELISA automated work stations is recommended for blood screening and 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 full 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/Substrate is colorless 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).
5. Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
6. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
7. Dissolve the Control Serum as described above and gently mix.
8. Prepare the Antigen/Conjugate complex as reported before.
9. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.

10. 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.
11. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
12. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
13. Check that the micropipettes are set to the required volume.
14. Check that all the other equipment is available and ready to use.
15. 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.

Two procedures can be carried out with the device according to the request of the clinician.

M.1 Quantitative analysis

1. Place the required number of strips in the microplate holder. Leave A1 and B1 wells empty for the operation of blanking. Store the other strips into the bag in presence of the desiccant at 2..8°C, sealed.
2. Dilute samples 1:101 dispensing 1 ml Specimen Diluent into a disposable tube and then 10 ul sample; mix on vortex before use. Do not dilute the calibrators and the control serum as they are ready-to-use.
3. Prepare the Antigen/Conjugate complex as reported in Section H.
4. Pipette 100 µl of all the Calibrators and 100 µl of Control Serum in duplicate; then dispense 100 µl of samples. The Control Serum is used to verify that the whole analytical system works as expected. Check that Calibrators Control Serum and samples have been correctly added. Then incubate the microplate at **+37°C for 60 min**.

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

5. Wash the microplate as reported in section I.3.
6. In all the wells, except A1 and B1, pipette 100 µl Antigen/ Conjugate Complex. Check that the reagent has been correctly added. Incubate the microplate at **+37°C for 60 minutes**.

Important note: Be careful not to touch the inner surface of the well with the pipette tip when dispensing the Complex. Contamination might occur.

7. Wash the microplate as described in section I.3.
8. Pipette 100 µl TMB/H₂O₂ mixture in each well, the blank wells A1+B1 included. Check that the reagent has been correctly added. Then incubate the microplate at **room temperature for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct light as a high background might be generated.

9. Stop the enzymatic reaction by pipette 100 µl Sulphuric Acid into each well and using the same pipetting sequence as in step 7. Then measure the color intensity with a microplate reader at 450nm (reading) and at 620-630nm (blanking, mandatory), blanking the instrument on A1, or B1 or both wells.

M.2 Qualitative analysis

1. Place the required number of strips in the microplate holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking. Store the other strips into the bag in presence of the desiccant at 2..8°C, sealed.

2. Dilute samples 1:101 dispensing 1 ml Specimen Diluent into a disposable tube and then 10 ul sample; mix on vortex before use. Do not dilute the calibrators as they are ready-to-use.
3. Prepare the Antigen/Conjugate complex as reported in Section H.
4. Pipette 100 µl CAL 1 in duplicate, 100 µl CAL 2 in duplicate, 100 µl CAL 5 in single. Then dispense 100 µl of samples. Check that Calibrators and samples have been correctly added. Then incubate the microplate at **+37°C for 60 min**.

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

5. Wash the microplate as reported in section I.3.
6. In all the wells, except A, pipette 100 µl Antigen/ Conjugate Complex. Check that the reagent has been correctly added. Incubate the microplate at **+37°C for 60 minutes**.

Important note: Be careful not to touch the inner surface of the well with the pipette tip when dispensing the Complex. Contamination might occur.

7. Wash the microplate as described in section I.3.
8. Pipette 100 µl TMB/H₂O₂ mixture in each well, the blank well A1 included. Check that the reagent has been correctly added. Then incubate the microplate at **room temperature for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct light as a high background might be generated.

9. Stop the enzymatic reaction by pipette 100 µl Sulphuric Acid into each well and using the same pipetting sequence as in step 7. Then measure the color intensity with a microplate reader at 450nm (reading) and at 620-630nm (blanking, mandatory), blanking the instrument on A1.

Important general 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 should ideally be performed immediately after the addition of the Stop Solution but definitely no longer than 20 minutes afterwards. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to a higher background.

N. ASSAY SCHEME

Calibrators	100 ul
Control Serum (*)	100 ul
Samples diluted 1:101	100 ul
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 ul
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 mix	100 ul
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 in quantitative assays is reported below:

		Microplate											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S3										
B	BLK	CAL4	S4										
C	CAL1	CAL5	S5										
D	CAL1	CAL5	S6										
E	CAL2	CS(*)	S7										
F	CAL2	CS(*)	S8										
G	CAL3	S1	S9										
H	CAL3	S2	S10										

Legenda: BLK = Blank // CAL = Calibrators // 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	S 2	S 10										
B	CAL1	S 3	S 11										
C	CAL1	S 4	S 12										
D	CAL2	S 5	S 13										
E	CAL2	S 6	S 14										
F	CAL5	S 7	S 15										
G	S 1	S 8	S 16										
H	S 2	S 9	S 17										

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:

Parameters	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm
Calibrator 1 0 arbU/ml	< 0.200 OD450nm after blanking
Calibrator 2 10 arbU/ml	OD450nm higher than the OD450nm of CAL 1 + 0.100
Calibrator 5 100 arbU/ml	> 1.000 OD450nm
Coefficient of variation	< 30% for the Calibrator 1

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 perform the following checks:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not become contaminated during the assay
CAL 1 OD450nm > 0.200 coefficient of variation > 30%	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; 3. that no mistake has been done in the assay procedure when the dispensation of calibrators is carried out; 4. that no contamination of the Cal 1 or of the

	wells where it was dispensed has occurred due to spills of positive samples or Antigen/Conjugate complex; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the Antigen/Conjugate complex 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
CAL 2 OD450nm < Cal 1 + 0.100	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution (ex.: dispensation of a wrong calibrator); 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 5 OD450nm < 1.000	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution; 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibration has occurred.

**** Note:**

If Control Serum has used, verify the following data:

Check	Requirements
Control Serum	OD450nm = OD450nm CAL 20 arbU/ml +/-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 performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution (e.g.: dispensation of a wrong calibrator); 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 5), 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 9.

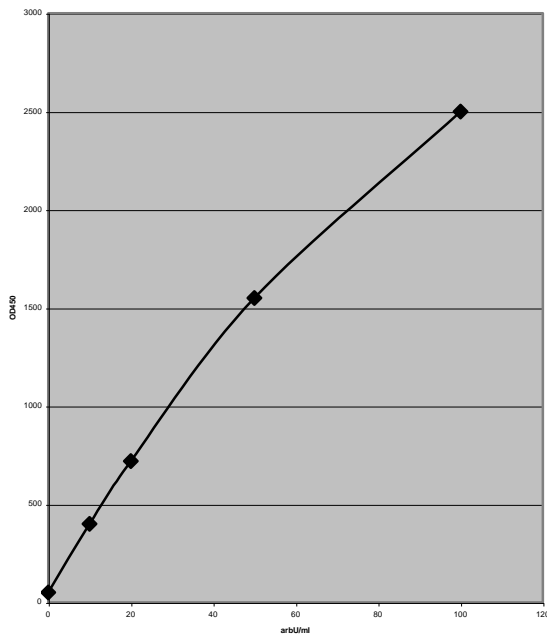
P. RESULTS

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 EBV VCA IgM antibody in samples.

An example of Calibration curve is reported below.



Note: Do not use these data to calculate the real assay results. The figures above are reported only as an example.

P.2 Qualitative method

Check that the assay is valid.
An example is provided below:

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the reading step described in the section M, point 9):

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 0.200 – Accepted
 Calibrator 10 arbU/ml: 0.250 – 0.270 OD450nm
 Mean Value: 0.260 OD450nm
 Higher than CAL 1 + 0.100 – 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 IgM in the sample.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Samples with a concentration lower than 10 arbU/ml are considered negative for anti EBV VCA IgM antibody.
 Samples with a concentration higher than 10 arbU/ml are considered positive for anti EBV VCA IgM antibody. The patient is likely to be in the acute phase of infection (mononucleosis).

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

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
3. 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 panels of negative and positive samples with reference to a commercial kit.

1. Limit of detection

No international standard for EBV VCA IgM Antibody detection has been defined so far by the European Community.
 In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient in the acute phase of mononucleosis infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The assay is based on the "IgM Capture" method and on affinity purified native VCA antigen in order to provide the highest specificity and sensitivity.
 The diagnostic sensitivity was studied on more than 50 samples, pre-tested positive with the reference kit of European origin in use at the laboratory. Positive samples were collected from patients undergoing acute mononucleosis infection.
 The diagnostic specificity was determined on panels of more than 250 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 %

3. Reproducibility:

Data obtained from a study conducted on three samples of different VCA IgM reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs showed CV% results ranging 2-8%, depending on the OD450nm/620-630nm readings.
 The variability shown in the tables did not result in sample misclassification.

S. LIMITATIONS

False positivity has been assessed as less than 2 % of the normal population, mostly due to high titers of Rheumatoid Factor. IgM capture systems, even if acknowledged to be more specific than sandwich assays, may in fact be influenced by this kind of interfering substance. Frozen samples containing fibrin particles or aggregates may generate false positive results.

T. CONFIRMATION TEST

In order to provide the medical doctor with the best accuracy in testing for EBV infection, a confirmation assay is reported. The confirmation test has to be carried out on any positive sample before a diagnosis of primary infection of EBV is released to the doctor.

Proceed for confirmation as follows:

1. Prepare the Antigen/Conjugate Complex as described in the proper section.
2. The well A1 of the strip is left empty for blanking.
3. CAL 2 (10 arbU/ml) is dispensed in the strip in positions B1+C1.
4. The positive sample to be confirmed, diluted 1:101, is dispensed in the strip in position D1+E1.
5. The strip is incubated for 60 min at +37°C.
6. After washing, the blank well A1 is left empty.
7. 100 µl of Antigen/Conjugate Complex are dispensed in wells B1+C1+D1.
8. Then 100 µl of Enzyme Conjugate (CONJ) alone are added to well E1. **Note:** *This material does not contain any VCA antigen, only the conjugate*
9. The strip is incubated for 60 min at +37°C.
10. After washing, 100 µl Chromogen/Substrate are added to all the wells and the strip is incubated for 20 min at r.t.
11. 100 µl Sulphuric Acid are added to all the wells and then their color intensity is measured at 450nm (reading filter) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

Interpretation of results is carried out as follows:

1. If the sample in position D1 shows an OD450nm/620-630nm lower than the one of CAL 2, a problem of dispensation or contamination in the first test is likely to be occurred. The Assay Procedure in Section M has to be repeated to double check the analysis.
2. If the sample in position D1 shows an OD450nm/620-630nm value higher than the one of CAL 2 and in position E1 shows an OD450nm/620-630nm value still higher than the one of CAL 2, the sample is considered a **false positive**. The reactivity of the sample is in fact not dependent on the specific presence of EBV VCA antigens and a crossreaction with the enzyme conjugate has occurred.
3. If the sample in position D1 shows an OD450nm/620-630nm value higher than the one of CAL 2 and in position E1 shows an OD450nm/620-630nm value lower the one of CAL 2, the sample is considered a **true positive**. The reactivity of the sample is in fact dependent on the specific presence of EBV VCA antigens and not due to any crossreaction with the conjugate alone.

The following table is reported for the interpretation of results:

Well	OD450nm/620-630nm		
	D1	< CAL 2	> CAL 2
E1	< CAL 2	> CAL 2	< CAL 2
Interpretation	Problem of contam.	False positive	True positive

REFERENCES

1. Evans AS and Niederman JC, Am J Clin Pathol, 1982, 77(5): 555-60
2. Fleisher GR, Collins M and Fager S, J Clin Microbiol, 1983, 17(4): 619-24
3. Howitz CA, Henle G et al., Am J Med, 1977, 63(6): 947-57.
4. Straus SE, Cohen JL, Tosato G et al., Ann Intern Med, 1993, 118(1): 45-58
5. Engvall E. and Perlmann P.. J. Immunochemistry, 8, 871-874, 1971
6. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol. 109, 129-135, 1971
7. Volk W.A.. In "Essential of Medical Microbiology". 2nd ed. pp 729, G.B.Lippincott Company, Philadelphia, New York, S.Josè, Toronto.
8. Betts R.F. and al.. Journal of Infectious Diseases, 143:821-826, 1981.
9. Engelhard D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 163:628-630, 1991.
10. Griffiths P.D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 145. 647-653, 1982
11. Kraat Y.J. et al.. Journal of Clin.Microbiol.. 30: 522-524, 1992.
12. Landini M.P. et al.. Eur.J.Clin.Microbiol.. 8: 159-163, 1989

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



VCA IgM

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA)
de “captura” para la determinación
cualitativa/cuantitativa de anticuerpos
IgM al antígeno de la Cápside
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 VCAM.CE
96 pruebas

VCA IgM

A. OBJETIVO DEL ESTUCHE.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa/cuantitativa de anticuerpos IgM al Antígeno de la Cápsida(VCA) del Virus Epstein Barr (EBV), en plasma y suero humanos, mediante un sistema de "captura".

El estuche ha sido concebido para la clasificación del agente viral así como para el seguimiento de pacientes infectados con EBV.

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. Perteneciente 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 antígenos inmunodominantes del virus, constituye una herramienta importante para el monitoreo de pacientes infectados por EBV.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El análisis se basa sobre el método de "Captura IgM" y sobre antígeno nativo VCA purificado por afinidad,

Las microplacas están recubiertas con un anticuerpo policlonal anti-IgM que captura los anticuerpos de esta clase presentes en la muestra.

Luego del lavado que elimina el resto de los componentes de la muestra, en la segunda incubación los anticuerpos IgM anti VCA de EBV inmovilizados en la fase sólida son detectados mediante un complejo compuesto por el antígeno nativo VCA purificado por afinidad, biotinilados y estreptavidina marcada 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 IgM presentes en la muestra, detectable mediante un lector ELISA.

La cuantificación de los anticuerpos IgM, en ausencia de un estándar internacional de referencia, es posible con ayuda de una curva estándar de calibración.

D. COMPONENTES.

Cada estuche contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLATE

12 tiras x 8 pocillos intercambiables recubiertos con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgM humano específico (cadena u) y 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 = 10 arbU/ml

2 ml CAL3 = 20 arbU/ml

2 ml CAL4 = 50 arbU/ml

4 ml CAL 5 = 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 IgM humanos anti VCA de EBV a $20 \pm 20\%$ arbU/ml, 0.2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 0.045% como preservativos.

Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del vial varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen correcto reportado en la etiqueta.

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 6.0+/- 0.1, Tween 20 al 0.05% y ProClin 300 al 0.045%.

5. Conjugado: CONJ 20X

1x0.8 ml/vial. Solución concentrada 20x. Contiene estreptavidina marcada con peroxidasa (HRP), disuelta en 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. Diluyente de Antígeno: AG DIL

n° 1 vial de 16 ml. Solución tamponada proteica para la preparación del antígeno VC EBV. Contiene tampón Tris 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, 2% de BSA, además de 0.2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 0.045% como preservativos. El reactivo está codificado con el color rojo (0.01% de colorante rojo).

7. Antígeno VCA EBV : Ag VCA

1x6 viales. Reactivo liofilizado para disolver en 1.9 ml de Diluyente del Antígeno, según se indica más adelante. Contiene antígeno nativo VCA purificado por afinidad, tampón Tris HCl 25 mM pH 7.8+/-0.1 además de 0.5 de BSA como soporte proteico .

8. Diluyente de muestras DILSPE

2x60ml. Solución tamponada proteica para la dilución de las muestras. Contiene 2% de caseína, tampón Tris 0.2 M a pH 6.0 +/- 0.1, 0.2% de Tween 20, además de azida sódica al 0.09% y 0.045% de ProClin 300 como preservativos.

El reactivo está codificado con el color azul.

9. 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.

10. Ácido Sulfúrico: H2SO4 0.3M

1x15ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0.3M

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

11. Sellador adhesivo, n° 2

12. Manual de instrucciones, n° 1

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (rangos de 10 a 1000 µl) 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 6 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. Evitar adicionar conservantes a las muestras, especialmente azida sódica, ya que pueden afectar la actividad enzimática del conjugado.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Estudios de estabilidad realizados en estuches en uso (hasta 6 veces) no han arrojado pérdida de actividad significativa en un período de 3 meses.

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:

Reactivo liofilizado. Disolver en agua de calidad ELISA según el volumen indicado en la etiqueta.

Nota: Para preservar la reactividad se recomienda mantenerlo congelado en alícuotas a -20°C . No recongelar.

Solución de Lavado Concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada debe diluirse 20x con agua bidestilada hasta alcanzar 1200 ml 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 .

Complejo Antígeno-Conjugado:

Proceder cuidadosamente según se indica:

1. Disolver el contenido de un vial liofilizado utilizando 1.9 ml de Diluyente Antígeno. Dejar disolver completamente y luego mezclar cuidadosamente con el vórtex.
2. Mezclar el Conjugado concentrado con ayuda del vórtex. Añadir luego 0.1 ml del mismo al vial del Ag EBV VC disuelto y mezclar suavemente en el vórtex.

Notas Importantes:

1. Disolver y preparar solamente los viales necesarios para la prueba. El inmunocomplejo obtenido no es estable. Almacenar la solución sobrante en alícuotas a -20°C .
2. La preparación del inmunocomplejo debe realizarse justo antes de dispensar las muestras y los controles en la placa. Mezclar nuevamente en vórtex justo antes de usar.

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.

1. 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 o los reactivos (alcohol 70%, lejía 10%, de calidad de los desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de $\pm 2\%$. Deben descontaminarse periódicamente los residuos de los componentes del estuche.
2. La incubadora de ELISA debe ser ajustada a 37°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ de tolerancia) 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.
3. 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.
4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de $\pm 5\%$.
5. El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro de 620-630nm, mandatory para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda $\leq 10\text{nm}$ 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.
6. 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 interno de calidad". 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 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 pesquaje en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.
7. 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.

1. Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del estuche (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Compruebe que los componentes líquidos no están contaminados con partículas o agregados visibles.
3. Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico.
4. Compruebe que no han ocurrido rupturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte.
5. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
6. Diluir totalmente la Solución de Lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
7. Disolver el Suero Control como se ha descrito anteriormente y mezclar suavemente.
8. Preparar el Complejo Antígeno/Conjugado según se reporta anteriormente.
9. Dejar los componentes restantes alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
10. 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.
11. Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
12. En caso de trabajar automáticamente, encender el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
13. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
14. Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
15. 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.

Pueden ser realizados dos tipos de procedimiento de acuerdo a los requerimientos clínicos.

M.1 Análisis Cuantitativo.

1. 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. Almacenar a 2..8°C las tiras sobrantes en la bolsa, selladas con el desecante.
2. 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 y el Suero Control disuelto ya que están listos para el uso.
3. Preparar el Complejo Antígeno/Conjugado según se indica en la sección H.
4. Dispensar 100µl de los Calibradores y 100µl del Suero Control por duplicado, luego dispensar 100µl de las muestras diluidas. El Suero Control se emplea para verificar que el sistema analítico funcione como es debido. Comprobar que el Suero Control, los Calibradores y las muestras han sido

añadidos adecuadamente. 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. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.

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. Luego de la segunda incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
8. Dispensar 100µl de Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluidos los del blanco. Controlar que los reactivos han sido correctamente añadidos. Incubar la microplaca durante **20 minutos a temperatura ambiente**.

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

9. Dispensar 100µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso. 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.

1. 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. Almacenar a 2-8°C las tiras sobrantes en la bolsa, selladas con el desecante.
2. 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 y el Suero Control disuelto ya que están listos para el uso.
3. Preparar el Complejo Antígeno/Conjugado según se indica en la sección H.
4. Dispensar 100 µl del Calibrador 1 por duplicado, 100 µl del Calibrador 2 por duplicado, 100 µl del Calibrador 5 simple. Dispensar 100 µl de las muestras en los pocillos correspondientes. Comprobar que los Calibradores y las muestras han sido añadidos adecuadamente. 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 Complejo Antígeno/Conjugado en todos los pocillos, excepto A1. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.

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. Luego de la segunda incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).

8. Dispensar 100µl de Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1. Controlar que los reactivos han sido correctamente añadidos. Incubar la microplaca durante **20 minutos a temperatura ambiente**.

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

9. Dispensar 100µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 7. Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección 1.5, 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:

- Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
- 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

Calibradores	100 ul
Suero Control(*)	100 ul
Muestras diluidas 1:101	100 ul
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Conjugado	100 ul
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Cromógeno/Substrato	100ul
3ª incubación	20 min
Temperatura	t.a.°
Acido Sulfúrico	100 ul
Lectura D.O.	450nm/620-630nm

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	M 3									
B	BL	CAL4	M 4									
C	CAL1	CAL5	M 5									
D	CAL1	CAL5	M 6									
E	CAL2	SC(*)	M 7									
F	CAL2	SC(*)	M 8									
G	CAL3	M1	M 9									
H	CAL3	M2	M10									

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	M 11									
B	CAL1	M4	M 12									
C	CAL1	M5	M 13									
D	CAL2	M6	M 14									
E	CAL2	M7	M 15									
F	CAL5	M8	M 16									
G	M1	M9	M 17									
H	M2	M10	M 18									

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

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza un grupo de pruebas con los controles 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	< 0.100 DO450nm
Calibrador 1 0 arbU/ml	< 0.200 DO450nm después de leer el blanco
Calibrador 2 10 arbU/ml	DO450nm mayor que DO450nm del CAL 1 + 0.100
Calibrador 5 100 arbU/ml	> 1.000 DO450nm
Coefficiente de variación	< 30% para el Calibrador 1

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 DO450nm > 0.100DO450nm	la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
CAL 1 DO450nm > 0.200 Coefficiente 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 Cal 1 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 Complejo Antígeno/Cconjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.

CAL 2 DO450nm < Cal 1 + 0.100	<ol style="list-style-type: none"> 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 5 DO450nm < 1.000	<ol style="list-style-type: none"> 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.

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

**** Nota**

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

Parámetro	Exigencia
Suero Control	DO450nm = DO450nm del CAL 20 arbU/ml +/-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	<ol style="list-style-type: none"> 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, CAL5) se corresponden con los requisitos establecidos, la prueba puede considerarse válida.

Nota importante:

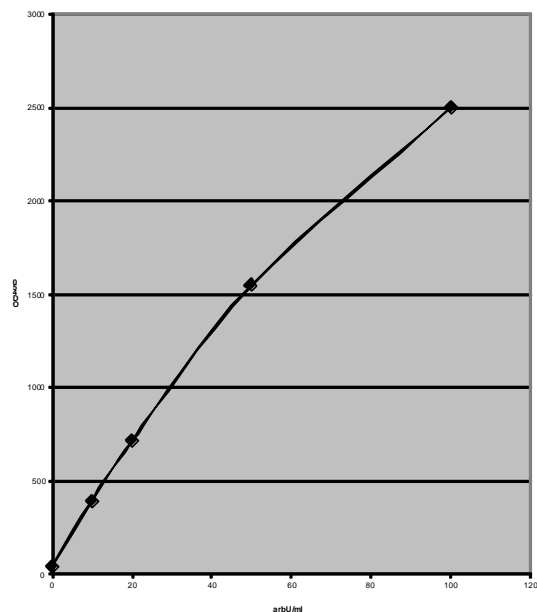
El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 9.

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 IgM anti-VCA EBV 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.

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 9).

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 0.200 – Válido
 Calibrador 10 arbU/ml: 0.250 – 0.270 DO450nm
 Valor medio: 0.260 DO450nm
 Mayor de CAL 1 + 0.100 – 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 IgM contenida en la muestra.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Las muestras con una concentración menor de 10 arbU/ml se consideran negativas a IgM anti-VCA EBV.

Las muestras con una concentración mayor de 10 arbU/ml se consideran positivas a IgM anti-VCA EBV. El paciente probablemente se encuentra en la fase aguda de la infección (mononucleosis).

Los resultados de la prueba para la detección de IgM anti-VCA, por si solos no son suficientes para establecer un diagnóstico efectivo. Es necesario combinarlos a la detección de IgG EBNA. 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 utilizando paneles con muestras negativas y positivas y un estuche comercial de referencia.

1. Límite de detección.

La Comunidad Europea no ha definido hasta el momento ningún estándar internacional para la detección de anticuerpos IgM contra el Antígeno de la Cápside 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:

El análisis se basa sobre el método de "Captura IgM" y sobre antígeno nativo VCA purificado por afinidad en grado de garantizar al ensayo la máxima sensibilidad e 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 en la fase aguda de la mononucleosis.

La especificidad diagnóstica ha sido determinada utilizando paneles con más de 250 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, examinadas en 16 réplicas, en tres corridas separadas, se obtuvo un CV de 2 a 8%, 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 menos del 2% de la población normal, debido mayormente a altos títulos de Factor Reumatoide. El sistema de captura de IgM, aún cuando se ha demostrado más específico que el sistema "sandwich", puede verse afectado por estas sustancias interferentes.

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

T. PRUEBA DE CONFIRMACIÓN.

Se ejecuta esta prueba con el propósito de garantizar a los médicos la mayor precisión del ensayo en la detección del EBV. La misma debe realizarse a cada una de las muestras positivas, antes de emitir un diagnóstico de infección primaria por EBV.

Proceder para la confirmación como sigue:

1. Preparar el Complejo Antígeno/Conjugado según se indica en la sección H.
2. Dejar vacío el pocillo A1 para el blanco.
3. Dispensar el CAL 2 (10 arbU/ml) en las posiciones B1+C1.
4. Diluir la muestra positiva 1:101 y dispensarla en la posición D1+E1.
5. Incubar la tira 60 minutos a +37°C.
6. Luego del lavado el pocillo A1 para el blanco queda vacío.
7. Dispensar 100 µl de Complejo Antígeno/Conjugado en los pocillos B1+C1+D1.
8. Adicionar al pocillo E1 100 µl de Conjugado (**CONJ**).
Nota: Este material no contiene antígenos VCA, solo el conjugado.
9. Incubar la tira 60 minutos a +37°C.
10. Adicionar, luego del lavado, 100 µl de Cromógeno/Substrato en todos los pocillos e incubar 20 minutos a r.t.
11. Dispensar 100µl de Ácido Sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, 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 (blanco).

La interpretación de los resultados se realiza de la siguiente forma:

1. Si la muestra en posición D1 tiene un valor de DO450nm/620-630nm menor del valor del CAL 2, probablemente en el primer ensayo haya ocurrido un error en el dispensado o alguna contaminación. Debe repetirse el Procedimiento del Ensayo, sección M.
2. Si la muestra en posición D1 tiene un valor de DO450nm/620-630nm mayor del valor del CAL 2, y en posición E1 el valor de DO450nm/620-630nm es todavía mayor que el del CAL 2, la muestra se considera un **falso positivo**. La reactividad de la muestra, en este caso, no depende de la presencia específica de antígenos VCA EBV, por lo que probablemente ha ocurrido una reacción cruzada con la enzima conjugada.
3. Si la muestra en posición D1 tiene un valor de DO450nm/620-630nm mayor del valor del CAL 2, y en posición E1 el valor de DO450nm es menor que el del CAL 2, se considera **realmente positiva**. La reactividad de la muestra, en este caso se debe a la presencia específica de antígenos VCA EBV y no a reacciones cruzadas.

En la siguiente tabla se muestra la interpretación de los resultados:

Pocillo	DO450nm		
	D1	< CAL 2	> CAL 2
E1	< CAL 2	> CAL 2	< CAL 2
Interpretación	Probl. de contam.	Falso positivo	Realmente positivo

BIBLIOGRAFÍA.

1. Evans AS and Niederman JC, Am J Clin Pathol, 1982, 77(5): 555-60
2. Fleisher GR, Collins M and Fager S, J Clin Microbiol, 1983, 17(4): 619-24
3. Howitz CA, Henle G et al., Am J Med, 1977, 63(6): 947-57.
4. Straus SE, Cohen JL, Tosato G et al., Ann Intern Med, 1993, 118(1): 45-58
5. Engvall E. and Perlmann P.. J. Immunochemistry, 8, 871-874, 1971
6. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol. 109, 129-135, 1971
7. Volk W.A.. In "Essential of Medical Microbiology". 2nd ed. pp 729, G.B.Lippincott Company, Philadelphia, New York, S.José, Toronto.
8. Betts R.F. and al.. Journal of Infectious Diseases, 143:821-826, 1981.
9. Engelhard D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 163.628-630, 1991.
10. Griffiths P.D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 145. 647-653, 1982
11. Kraat Y.J. et al.. Journal of Clin.Microbiol.. 30: 522-524, 1992.
12. Landini M.P. et al.. Eur.J.Clin.Microbiol.. 8: 159-163, 1989

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



