

# Ea IgG

**Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for  
the quantitative/qualitative  
determination of IgG antibodies to  
Epstein Barr Virus Early 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](mailto:info@diapro.it)

## Ea IgG

### A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the quantitative/qualitative determination of IgG antibodies to Epstein Barr Virus Early 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 (Nuclear Antigen, Viral Capsid Antigen, Early Antigen) has become therefore an important and useful determination for the monitoring and follow-up of EBV infected patients.

### C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with EBV-specific affinity purified Early Antigen or EA.

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

After washing out all the other components of the sample, in the 2<sup>nd</sup> incubation bound anti-EA IgG are detected by the addition of anti hlgG antibody, 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 anti EA IgG antibodies present in the sample.

IgG in the sample may be quantitated by means of a standard curve calibrated in arbitrary units per milliliter (Uarb/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 EBV Ea**. 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° ..

6 vials. 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

2 ml 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. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

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

#### 6. Sulphuric Acid: H2SO4 0.3 M

1x15ml/viallt contains 0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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-born 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 6 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 venipuncture 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 0.2-0.8µ filters to clean up the sample for testing.

6. Samples whose anti-Ea 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 µl of each specimen with 450 µl of Cal 0 (1:10). Then 50 µl of the 1:10 dilution are diluted with 450 µl 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.

##### 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 ±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 ≥ 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 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 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. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
6. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
7. 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.
8. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
9. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
10. Check that the micropipettes are set to the required volume.
11. Check that all the other equipment is available and ready to use.
12. 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 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.

- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
- Wash microwells as in step 5.
- 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.

- 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 and the positive samples from blue to yellow.
- 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:

- 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.
- Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.
- Dispense 100 µl of Calibrator 0 arbU/ml and Calibrator 5 arbU/ml in duplicate and Calibrator 100 arbU/ml in single. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
- 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.

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

- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
- Wash microwells as in step 5.
- 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.

- 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 yellow to blue.
- 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:

- Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.
- 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	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
<b>1<sup>st</sup> incubation</b>	<b>60 min</b>
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
<b>2<sup>nd</sup> incubation</b>	<b>60 min</b>
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl
<b>3<sup>rd</sup> incubation</b>	<b>20 min</b>
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm/620-360nm

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 3										
B	BLK	CAL4	S 4										
C	CAL1	CAL5	S 5										
D	CAL1	CAL5	S 6										
E	CAL2	CAL6	S 7										
F	CAL2	CAL6	S 8										
G	CAL3	S1	S 9										
H	CAL3	S2	S 10										

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrator S = Sample

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 3	S 11										
B	CAL1	S 4	S 12										
C	CAL1	S 5	S 13										
D	CAL2	S 6	S 14										
E	CAL2	S 7	S 15										
F	CAL6	S 8	S 16										
G	S1	S 9	S 17										
H	S2	S 10	S 18										

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrators S = Sample

### O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls 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 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
<b>Blank well</b> > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Sustrate solution has not got contaminated during the assay
<b>CAL 1</b> <b>0 arbU/ml</b> > 0.150 OD450nm after blanking  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 (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.
<b>CAL 2</b> <b>5 arbU/ml</b>  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.
<b>CAL 6</b> <b>100 arbU/ml</b>  < 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.

#### Important note:

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

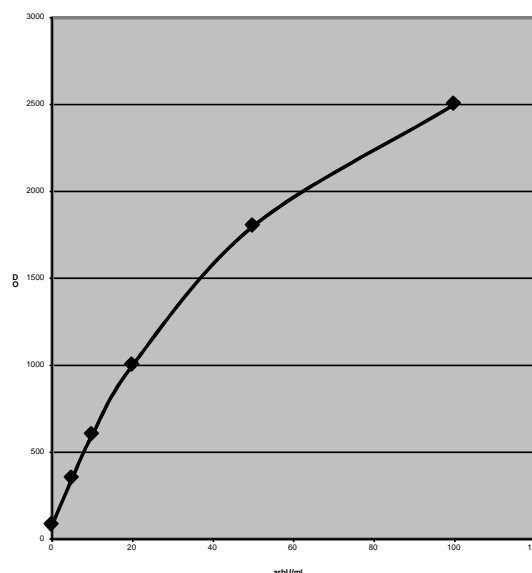
### P. RESULTS

#### 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 Eα 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 5 arbU/ml and then check that the assay is valid.

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as 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 5 arbU/ml: 0.250 – 0.270 OD450nm

Mean Value: 0.260 OD450nm

Higher than Cal 0 + 0.100 – Accepted

Calibrator 100 arbU/ml: 2.045 OD450nm

Higher than 1.000 – Accepted

The OD450nm/620-630nm of the Calibrator 5 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 5 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-Ea IgG antibody.

Samples with a concentration higher than 5 arbU/ml are considered positive for anti-Ea IgG antibody.

Ea IgG results alone are not, anyway, enough to provide a clear diagnosis of EBV infection.

At least EBV VCA IgG and EBV VCA IgM results, possibly together with EBNA IgG, are necessary in combination.

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

VCA IgM	EBNA (or VCA) 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 negative and positive samples with reference to a FDA approved commercial kit.

#### 1. Limit of detection

No international standard for Ea 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 diagnostic performances were evaluated in a performance evaluation study conducted in an external centre, with excellent experience in the diagnosis of infectious diseases.

The diagnostic sensitivity was studied on samples, pre-tested positive with a different reference kit 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 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 Ea IgG reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs show CV% values ranging 3-16% depending on 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 2-5% of the normal population depending on the reference kit used.

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

### 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.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.

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System in compliance with EN 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







# Ea IgG

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cuantitativa/cualitativa de anticuerpos IgG contra el antígeno temprano del virus de 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

Correo electrónico: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

REF. EAG.CE  
96 pruebas

## Ea IgG

### A. OBJETIVO DEL EQUIPO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cuantitativa/cualitativa de anticuerpos IgM contra el antígeno temprano del virus de Epstein-Barr en plasma y suero humanos.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

### B. INTRODUCCIÓN

El virus de Epstein-Barr o EBV es el principal agente etiológico de la mononucleosis infecciosa, así como uno de los factores que contribuyen a la etiología del linfoma de Burkitt y del carcinoma nasofaríngeo (CNF). Perteneciente a la familia *Herpesviridae* y de distribución mundial, se estima que entre un 80 y un 90% de los adultos han sido infectados con este virus. Las infecciones primarias suelen producirse durante los primeros diez años de vida. Mientras que las infecciones infantiles suelen ser asintomáticas, entre el 50 y el 70% de los adultos jóvenes con infecciones primarias puede desarrollar de formas leves a severas de la enfermedad. El EBV puede producir una infección latente persistente que puede reactivarse por inmunosupresión o en pacientes con SIDA.

Debido a que la respuesta humoral a la infección primaria por EBV es bastante rápida, la clase y los niveles de anticuerpos presentes en la mayoría de los casos permiten determinar si un paciente todavía es vulnerable al virus, si la infección primaria es actual o reciente, si contrajo la infección en el pasado o si la infección por EBV se está reactivando. La detección de anticuerpos IgG, IgM e IgA específicos contra los antígenos inmunodominantes del virus (antígeno nuclear, antígeno de cápside viral, antígeno temprano) constituye un medio importante y útil de control y seguimiento de los pacientes infectados por EBV.

### C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

Se han recubierto las microplacas con antígeno temprano (EA) purificado por afinidad, específico de EBV.

En la 1ª incubación, la fase sólida se trata con muestras diluidas y las IgG anti EA son capturadas, si las hay, por los antígenos. Después del lavado, que elimina el resto de los componentes de la muestra, en la 2ª incubación se detectan las IgG anti EA unidas por la adición de anticuerpo anti hIgG, marcado con peroxidasa (HRP).

La enzima capturada en la fase sólida, combinada con la mezcla sustrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos anti EA IgG presentes en la muestra.

Puede cuantificarse la cantidad de IgG en la muestra por medio de una curva estándar calibrada en unidades arbitrarias por milímetro (Uarb/ml) ya que no hay disponible ningún estándar internacional.

### D. COMPONENTES

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

#### 1. Microplaca: MICROPLACA

12 tiras de 8 micropocillos recubiertos con **Ea EBV purificado por afinidad**. Las placas están en una bolsa sellada con desecante.

Dejar la microplaca a temperatura ambiente antes de abrirla, sellar las tiras sobranes en la bolsa con el desecante y conservar a 4 °C.

#### 2. Curva de calibración: CAL N° ...

6 viales. Curva estándar lista para el uso y codificada con color en el siguiente rango:

4 ml CAL1 = 0 Uarb/ml

4 ml CAL2 = 5 Uarb/ml

2 ml CAL3 = 10 Uarb/ml

2 ml CAL4 = 20 Uarb/ml

2 ml CAL5 = 50 Uarb/ml

4 ml CAL6 = 100 Uarb/ml.

Los estándares se calibran frente a un estándar de oro interno (IGS), ya que no se ha definido ningún estándar internacional.

Contiene proteínas de suero humano, 2% de caseína, tampón citrato sódico 10 mM a pH 6,0+/-0,1, 0,1% de Tween 20, azida sódica al 0,09% y ProClin 300 0,045% como conservantes. Los estándares son de color azul.

#### 3. Solución de lavado concentrada: WASHBUF 20X

1x60 ml/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%.

#### 4. Conjugado: CONJ

1x16 ml/vial. Listo para el uso y codificado con color rojo. Contiene anticuerpos policlonales anti IgG humana conjugados con peroxidasa (HRP), 5% de albúmina de suero bovino, tampón Tris 10 mM a pH 6,8+/-0,1, ProClin 300 0,045% y sulfato de gentamicina 0,02% como conservantes.

#### 5. Cromógeno/Sustrato: SUBS TMB

1x16 ml/vial. Contiene tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 3,5-3,8, dimetilsulfóxido 4%, tetra-metil-benzidina (TMB) 0,03% y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,02%.

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

#### 6. Ácido sulfúrico: H2SO4 0,3 M

1x15 ml/vial. Contiene solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 M.

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

#### 7. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60 ml/vial. Contiene 2% de caseína, tampón citrato sódico 10 mM a pH 6,0+/-0,1, 0,1% de Tween 20, azida sódica al 0,09% y ProClin 300 0,045% como conservantes. Utilizar para diluir la muestra.

#### 8. Sellador adhesivo, 2 uds.

#### 9. Manual de instrucciones, 1 ud.

### E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas (1000, 100 y 10 µl) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para eliminar oxidantes químicos usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubadora termostática de microplacas ELISA calibrada (en seco o húmedo), ajustada a +37 °C (+/-0,5 °C de tolerancia).
6. Lector calibrado de micropocillos ELISA con filtros de 450 nm (lectura) y 620-630 nm (blanco).
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

### F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo solo debe usarse por personal técnico adecuadamente instruido, bajo la supervisión de un médico responsable del laboratorio.

2. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada de laboratorio, guantes sin talco y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (aguja). Todo el personal involucrado debe tener formación en procedimientos de bioseguridad, como recomienda el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, EE. UU., y como ha publicado el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

Doc.:	INS EAG.CE/Esp	Página	3 de 7	Rev.: 2	Fecha: 2020/01
-------	----------------	--------	--------	---------	----------------

3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra VHB y VHA, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.

4. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire al abrir los viales del equipo y las microplacas, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno (TMB) a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.

5. Tras la recepción, conservar el equipo a una temperatura entre 2 y 8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en una cámara de refrigeración.

6. No intercambiar componentes de lotes distintos, ni tampoco de dos equipos del mismo lote.

7. Comprobar que los reactivos estén claros y no contengan partículas pesadas visibles ni agregados. Si no es así, informar al supervisor del laboratorio para realizar el procedimiento pertinente para reemplazar el equipo.

8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.

9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.

10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas internas (viales) y en las etiquetas del envase externo. Según estudios realizados en equipos abiertos, no se ha detectado pérdida relevante de actividad hasta 6 usos del dispositivo y 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 utilizar material plástico desechable para preparar los componentes líquidos o transferir los componentes a los equipos automatizados, a fin de evitar contaminaciones cruzadas.

13. Los desechos producidos durante el uso del equipo 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 procedentes del proceso de lavado, de restos de controles y muestras, deben tratarse como potencialmente infecciosos y deben inactivarse antes de su eliminación. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121 °C durante 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 adecuados designados para residuos de laboratorio/hospitalarios.

15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.

16. Los demás materiales de desecho que se generan durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben manipularse como fuentes potenciales de infección y deben eliminarse de acuerdo con las directivas nacionales y las 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 del laboratorio de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte a las muestras.

2. Las muestras deben identificarse claramente mediante códigos de barras o nombres, a fin de evitar una interpretación errónea de los resultados. Se recomienda el uso de código de barras y lectura electrónica.

3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas que contengan restos de

fibrina, partículas pesadas o filamentos y organismos 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 partículas, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con filtros de 0,2-0,8 micras.

6. Las muestras cuya concentración de anticuerpos anti Ea IgG se espera que sea superior a 100 Uarb/ml deberán diluirse antes del uso, 1:10 o 1:100 en el calibrador 0 Uarb/ml. Las diluciones deben realizarse en tubos desechables limpios, diluyendo 50 ul de cada muestra con 450 ul de Cal 0 (1:10). A continuación, se diluyen 50 ul de la dilución 1:10 con 450 ul de Cal 0 (1:100).

Mezclar bien los tubos en un vórtex y después proceder con el paso de dilución indicado en 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. Comprobar que el desecante no esté de color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de conservación.

De ser así, llamar al servicio de atención al cliente de Dia.Pro.

Las tiras de pocillos no utilizadas deben depositarse en la bolsa de aluminio con el desecante suministrado, cerrada herméticamente y conservada entre 2 y 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 cambia de amarillo a verde.

##### Curva de calibración:

Componente listo para usar. Mezclar cuidadosamente en un vórtex antes de usar.

##### Solución de lavado concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada debe diluirse 20x con agua bidestilada y mezclarse con cuidado 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 de lavado es estable durante 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 componente, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

##### 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 componente, usar solo contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

##### Diluyente de muestras

Componente listo para usar. Mezclar cuidadosamente en un vórtex antes de usar.

Doc.:	INS EAG.CE/Esp	Página	4 de 7	Rev.: 2	Fecha: 2020/01
-------	----------------	--------	--------	---------	----------------

#### 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 EQUIPO

- Las micropipetas deben estar 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 (alcohol de uso doméstico, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/-2%. También se debe llevar a cabo de forma regular la descontaminación de derrames o residuos de los componentes del equipo.
- La incubadora ELISA debe ajustarse a 37 °C (+/-0,5 °C de tolerancia) y controlarse 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 ±5%.
- El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450 nm y de un segundo filtro de 620-630 nm, obligatorio para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda ≤ 10 nm; b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2,0; c) Linealidad ≥ 2,0; reproducibilidad ≥ 1%. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe calibrarse periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente se debe proceder al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.

- En caso de usar un sistema automatizado ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura 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 instalarse en el sistema operativo de la unidad y validarse tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe validarse y fijarse correctamente. Debe prestarse especial atención para evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de contaminación de pocillos adyacentes. Se recomienda el uso de sistemas automatizados ELISA cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.
- El servicio de atención al cliente de Dia.Pro ofrece apoyo al usuario para ajustar y comprobar los instrumentos usados en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requisitos descritos. También se ofrece apoyo para la instalación de nuevos instrumentos para usar con el equipo.

#### L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO

- Comprobar la fecha de caducidad indicada en la parte externa del equipo (envase primario). No usar si ha caducado.
- Comprobar que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas o agregados visibles.
- Comprobar que el cromógeno (TMB) sea incoloro o azul pálido aspirando un pequeño volumen con una pipeta estéril de plástico.
- Comprobar que no se hayan producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte (envase primario). Comprobar que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté perforada ni dañada.
- Diluir todo el contenido de la solución de lavado concentrada 20x como se ha descrito anteriormente.
- Dejar los componentes restantes hasta alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
- Ajustar la incubadora de ELISA a 37 °C y alimentar 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.
- Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
- En caso de trabajar automáticamente, encender el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
- Comprobar que las micropipetas estén ajustadas al volumen requerido.
- Asegurarse de que el resto del equipamiento esté disponible y listo para el uso.
- En caso de que surja algún problema, detener el ensayo y avisar al responsable.

#### M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe realizarse de acuerdo con las instrucciones que se indican a continuación, teniendo cuidado de mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

El equipo puede utilizarse también para determinaciones cualitativas y cuantitativas.

#### M1. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA:

- Diluir las muestras 1:101 en un tubo de dilución adecuadamente definido (ejemplo: 1000 µl de diluyente de muestras + 10 µl de muestra). No diluir el juego de calibración ya que los calibradores están listos para el uso. Mezclar cuidadosamente todos los componentes líquidos en un vórtex y después proceder como se describe a continuación.

- Poner el número de micropocillos necesarios en el soporte. Dejar los pocillos A1 y B1 vacíos para la operación de blanco.
- Después dispensar 100 µl de calibradores por duplicado. A continuación, dispensar 100 µl de muestras diluidas en cada pocillo adecuadamente identificado.
- Incubar la microplaca durante **60 min. a +37 °C**.

**Nota importante:** Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado solo cuando se hace el ensayo manualmente. No cubrir las tiras cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.

- Lavar la microplaca con el lavador automático según se indica (sección I.3).
- Dispensar 100 µl de conjugado en cada pocillo, excepto en los pocillos de blanco A1+B1, y cubrir con el sellador. Comprobar que este componente de color rojo ha sido dispensado en todos los pocillos excepto el A1 y el B1.

**Nota importante:** Tener cuidado de no tocar la pared interna de plástico del pocillo con la punta de la pipeta que contiene el conjugado. Podría producirse contaminación.

- Incubar la microplaca durante **60 min. a +37 °C**.
- Lavar los micropocillos de igual forma que en el paso 5.
- Dispensar 100 µl de mezcla cromógeno/substrato en todos los pocillos, incluidos los pocillos de blanco A1 y B1. A continuación, incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24 °C) durante 20 minutos**.

**Nota importante:** No exponer a luz intensa directa. De lo contrario, se puede generar un fondo excesivo.

- Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usando la misma secuencia que en el paso 9. La adición del ácido cambia el color de los calibradores positivos y las muestras positivas de azul a amarillo.
- Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (sustracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1, B1 o ambos.

## M2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Si solo se requiere una determinación cualitativa, proceder como se indica a continuación:

- Diluir las muestras 1:101 en un tubo de dilución adecuadamente definido (ejemplo: 1000 µl de diluyente de muestras + 10 µl de muestra). No diluir el juego de calibración ya que los calibradores están listos para el uso. Mezclar cuidadosamente todos los componentes líquidos en un vórtex y después proceder como se describe a continuación.
- Poner el número de micropocillos necesarios en el soporte. Dejar el pocillo A1 vacío para la operación de blanco.
- Dispensar 100 µl de calibrador 0 Uarb/ml y calibrador 5 Uarb/ml por duplicado, y calibrador 100 Uarb/ml una sola vez. A continuación, dispensar 100 µl de muestras diluidas en cada pocillo adecuadamente identificado.
- Incubar la microplaca durante **60 min. a +37 °C**.

**Nota importante:** Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado solo cuando se hace el ensayo manualmente. No cubrir las tiras cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.

- Lavar la microplaca con el lavador automático según se indica (sección I.3).
- Dispensar 100 µl de conjugado en cada pocillo, excepto en el pocillo A1, y cubrir con el sellador. Comprobar que este

componente de color rojo se haya dispensado en todos los pocillos excepto el A1.

**Nota importante:** Tener cuidado de no tocar la pared interna de plástico del pocillo con la punta de la pipeta que contiene el conjugado. Podría producirse contaminación.

- Incubar la microplaca durante **60 min. a +37 °C**.
- Lavar los micropocillos de igual forma que en el paso 5.
- Dispensar 100 µl de la mezcla cromógeno/substrato en todos los pocillos, incluido el pocillo para el blanco. A continuación, incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24 °C) durante 20 minutos**.

**Nota importante:** No exponer a luz intensa directa. De lo contrario, se puede generar un fondo excesivo.

- Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos usando la misma secuencia que en el paso 9. La adición del ácido cambia el color de los calibradores positivos, el suero de control y las muestras positivas de amarillo a azul.
- Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (sustracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

### Notas generales importantes:

- Asegurarse de que no haya 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 desde su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

## N. ESQUEMA DEL ENSAYO

Método	Operaciones
Calibradores	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
<b>1ª incubación</b>	<b>60 min</b>
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado	100 µl
<b>2ª incubación</b>	<b>60 min</b>
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
TMB/H2O2	100 µl
<b>3ª incubación</b>	<b>20 min</b>
Temperatura	t.a.
Ácido sulfúrico	100 µl
Lectura DO	450 nm/620-630nm

A continuación se ofrece un ejemplo del esquema de dispensación para 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	CAL6	M 7										
F	CAL2	CAL6	M 8										
G	CAL3	M 1	M 9										
H	CAL3	M 2	M 10										

Leyenda: BL = Blanco CAL = Calibrador M = Muestra

A continuación se incluye un ejemplo del esquema de dispensado en ensayos cualitativos:

		Microplaca											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M 3	M 11										
B	CAL1	M 4	M 12										
C	CAL1	M 5	M 13										
D	CAL2	M 6	M 14										
E	CAL2	M 7	M 15										
F	CAL6	M 8	M 16										
G	M 1	M 9	M 17										
H	M 2	M 10	M 18										

Legenda: BL = Blanco CAL = Calibrador M = Muestra

### O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Se realiza una comprobación para validar los controles siempre que se utiliza el equipo, para verificar si el rendimiento del ensayo es el homologado.

Controlar que los datos siguientes coinciden:

Comprobar	Requisitos
Pocillo blanco	Valor < 0,100 DO 450 nm
CAL 1 0 Uarb/ml	Valor medio < 0,150 DO 450 nm después de leer el blanco Coeficiente de variación < 30%
CAL 2 5 Uarb/ml	DO 450 nm > DO 450 nm CAL1 + 0,100
CAL 6 100 Uarb/ml	DO 450 nm > 1,000

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pasar a la siguiente sección. En caso contrario, no continuar y hacer lo siguiente:

Problema	Comprobar
<b>Pocillo blanco</b> > 0,100 DO 450 nm	1. que la solución cromógeno/substrato no se haya contaminado durante el ensayo;
<b>CAL 1</b> <b>0 Uarb/ml</b> > 0,150 DO 450 nm después de leer el blanco  Coeficiente de variación > 30%	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador coinciden con los validados en los estudios previos de calificación; 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y se ha alimentado con esta el lavador antes del uso; 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el calibrador positivo en lugar del negativo); 4. no ha existido contaminación del calibrador negativo ni de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas o al conjugado; 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas ni con el conjugado; 6. las agujas del lavador no están bloqueadas o parcialmente obstruidas.
<b>CAL 2</b> <b>5 Uarb/ml</b>  DO 450 nm < DO 450 nm CAL1 + 0,100	1. que el procedimiento se haya ejecutado correctamente; 2. no se han cometido errores en su distribución (p. ej.: dispensar un calibrador equivocado); 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador coinciden con los validados en los estudios previos de calificación; 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.

<b>CAL 6</b> <b>100 Uarb/ml</b>  < 1,000 DO 450 nm	1. que el procedimiento se haya ejecutado correctamente; 2. no se han cometido errores en su distribución (dispensar un calibrador equivocado); 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador coinciden con los validados en los estudios previos de calificación; 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.
---	--

Si se produce alguno de estos problemas, tras la comprobación, informar al responsable para tomar las medidas pertinentes.

### Nota importante:

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

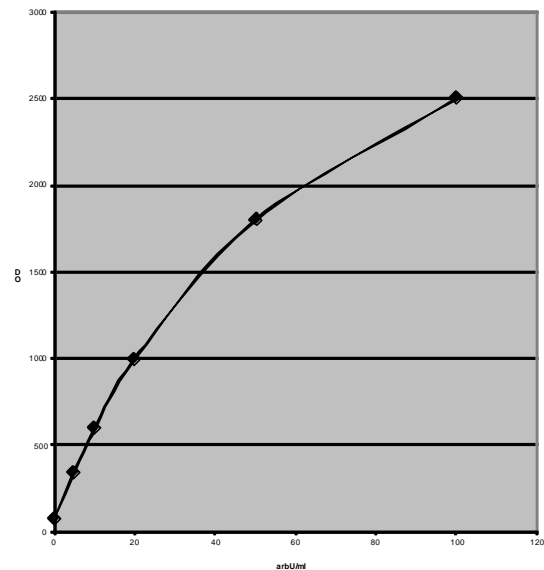
### P. RESULTADOS

#### P.1 Método cuantitativo

Si el ensayo resulta ser válido, usar para el método cuantitativo un programa aprobado de ajuste de curvas para trazar la curva de calibración a partir de los valores obtenidos con una lectura a 450nm/620-630nm (se recomienda la interpolación de 4 parámetros).

Después, en la curva de calibración, calcular la concentración de anticuerpos anti Ea IgG en las muestras.

A continuación se describe un ejemplo de curva de calibración.



### Nota importante:

No usar la curva de calibración anterior para hacer cálculos.

#### P.2 Método cualitativo

En el método cualitativo, calcular los valores medios DO 450nm/620-630nm para los calibradores 0 y 5 Uarb/ml y, a continuación, comprobar que el ensayo sea válido.

Ejemplo del cálculo (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11).

**Nota:** Los siguientes datos no deben usarse en lugar de los valores reales obtenidos en el laboratorio.

Calibrador 0 Uarb/ml: 0,020 – 0,024 DO 450 nm  
 Valor medio: 0,022 DO 450 nm  
 Menor de 0,150 – Válido  
 Calibrador 5 Uarb/ml: 0,250 – 0,270 DO 450 nm  
 Valor medio: 0,260 DO 450 nm  
 Mayor de Cal 0 + 0,100 – Válido  
 Calibrador 100 Uarb/ml: 2,045 DO 450 nm  
 Mayor de 1,000 – Válido

El valor de DO 450nm/620-630nm del calibrador 5 Uarb/ml se considera el valor de corte (Co) del sistema.

La relación entre el valor DO 450nm/620-630nm de la muestra y el valor DO450nm/620-630nm del calibrador 5 Uarb/ml (o M/Co) puede proporcionar una estimación semicuantitativa del contenido de IgG específicos en la muestra.

#### Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las muestras con una concentración inferior a 5 Uarb/ml se consideran negativas para anticuerpos anti Ea IgG.

Las muestras con una concentración superior a 5 Uarb/ml se consideran positivas para anticuerpos anti Ea IgG.

En cualquier caso, los resultados de la prueba Ea IgG por sí solos no son suficientes para establecer un diagnóstico claro de infección por EBV.

Se necesitan al menos los resultados de EBV VCA IgG y EBV VCA IgM, a ser posible junto con EBNA IgG, en combinación.

A continuación se muestra de forma esquemática un rango de referencia de los marcadores serológicos esenciales mínimos de infección por Epstein-Barr, derivado del manual de enfermedades infecciosas *Infectious Diseases Handbook*, 3ª edición, publicado por Lexi-Comp Inc., EE. UU.

VCA IgM	EBNA (o VCA) IgG	Interpretación
negativo	negativo	Sin historial de infección por EBV
positivo	negativo	Infección primaria grave
negativo	positivo	Historial de infección previa
positivo	positivo	Reactivación

#### Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable 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 realizado y comunicado al paciente por un médico cualificado.

#### R. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

La evaluación del rendimiento se ha realizado en un centro clínico externo, en muestras positivas y negativas, con respecto a un equipo comercial de referencia aprobado por la FDA.

##### 1. Límite de detección

La Comunidad Europea no ha definido ningún estándar internacional para la prueba de detección de anticuerpos Ea IgG hasta el momento.

Con el objetivo de garantizar una excelente y constante sensibilidad del dispositivo, se definió un estándar de oro interno (IGS) a partir de un paciente con historial de infección por mononucleosis previa.

##### 2. Sensibilidad y especificidad diagnóstica

La evaluación del rendimiento diagnóstico se realizó en un estudio de evaluación del rendimiento llevado a cabo en un centro externo con una experiencia excelente en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

La sensibilidad diagnóstica se estudió en muestras positivas previamente analizadas con un equipo de referencia distinto, de origen europeo, que se utiliza en el laboratorio. Se recogieron muestras positivas de pacientes que experimentaron infección por mononucleosis.

La especificidad diagnóstica fue determinada utilizando paneles de muestras negativas, provenientes de individuos sanos y donantes de sangre, clasificadas como negativas mediante el equipo de referencia, incluyendo muestras que podían interferir potencialmente.

Se empleó además plasma sometido a distintos métodos de preparación estándar (citrato, EDTA y heparina) y suero para determinar la especificidad. No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

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

En la evaluación del rendimiento se obtuvieron los siguientes valores:

Sensibilidad	≥ 98%
Especificidad	≥ 98%

#### 3. Reproducibilidad:

Los datos obtenidos en un estudio con tres muestras de diferente reactividad Ea IgG, examinadas en 16 réplicas en tres series separadas, presentaron valores CV% que oscilaban entre 3-16%, dependiendo de las lecturas de DO 450 nm.

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

#### S. LIMITACIONES

Se ha evaluado falso positivo en menos del 2-5% de la población normal, dependiendo del equipo de referencia utilizado.

Las muestras congeladas que contienen partículas de fibrina o agregados pueden generar 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.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.

Todos los productos IVD que fabrica la empresa están sujetos a control mediante un sistema de gestión de calidad certificado conforme con la norma EN ISO 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se comercializa solamente si cumple las especificaciones técnicas y los criterios de aceptación de la CE.

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



