

Ea IgM

**Enzyme ImmunoAssay for the
qualitative determination of IgM
antibodies to Epstein Barr Virus
Early Antigen (Ea)
in human plasma and sera**

- 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

Ea IgM

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the qualitative determination of IgM class antibodies to Epstein Barr Virus Early Antigen (Ea) in human plasma and sera.

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

Microplates are coated with affinity purified native EBV Ea.

The solid phase is first treated with the diluted sample and anti-Ea IgM are captured, if present, by the antigens.

After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti-Ea IgM are detected by the addition of anti hIgM 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 IgM antibodies present in the sample.

Interferences due to IgG and RF in samples are blocked directly into the well by a Neutralizing Reagent.

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 native Ea 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. Negative Control: CONTROL

1x4ml. Human serum base not reactive for anti-Ea IgM antibodies. It contains 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The Negative Control is pale yellow colour coded.

3. Positive Control: CONTROL +

1x4ml. Human serum base reactive for anti-Ea IgM antibodies. It contains 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin

300 as preservatives. The Positive Control is green colour coded.

4. 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.

5. Enzyme conjugate: CONJ

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

6. 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.

7. Neutralizing Reagent: SOLN NEUT

1x8ml. Proteic solution for the neutralization of IgG and RF in samples. It contains a detergent, proteic stabilizers, 0.1% sodium azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

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 (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-borne microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen/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 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. 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.

Controls

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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.

Specimen Diluent

Ready to use. Mix on vortex before use.

Neutralizing Reagent

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 $+37^{\circ}\text{C}$ (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 and the right temperature of $+37^{\circ}\text{C}$ is assured to the microplate.
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. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
8. Set the ELISA incubator at $+37^{\circ}\text{C}$ and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
9. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
10. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
11. Check that the micropipettes are set to the required volume.
12. Check that all the other equipment is available and ready to use.
13. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

1. 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 Controls as they are ready-to-use.
2. 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.
3. Dispense 50 μl Neutralizing Reagent in all the sample wells; do not dispense in A1 and in the Controls wells.

Important note: *The Neutralizing Reagent is able to block false positive reactions due to RF. Positive samples in internal QC panels might be detected negative if such samples were tested positive with an IVD that does not carry out any RF blocking reaction.*

4. Pipette 100 μl Negative Control in triplicate and 100 μl Positive Control in single into appropriate wells. Then dispense 100 μl of samples into the appropriate sample wells.
5. Incubate the microplate at **$+37^{\circ}\text{C}$ 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.

- Wash the microplate as reported in section I.3.
- In all the wells, except A1, pipette 100 µl Conjugate. 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 Conjugate. Contamination might occur.

- Wash the microplate as described in section I.3.
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate 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.

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

Important general 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 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

| | |
|---|--|
| Neutralizing Reagent (only for samples) | 50 ul |
| Controls | 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 |

An example of dispensation scheme is reported below:

Microplate

| | | | | | | | | | | | | |
|---|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | BLK | S4 | | | | | | | | | | |
| B | NC | S5 | | | | | | | | | | |
| C | NC | S6 | | | | | | | | | | |
| D | NC | S7 | | | | | | | | | | |
| E | PC | S8 | | | | | | | | | | |
| F | S1 | S9 | | | | | | | | | | |
| G | S2 | S10 | | | | | | | | | | |
| H | S3 | S11 | | | | | | | | | | |

Legenda: BLK = Blank // NC = Negative Control
PC = Positive Control // S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the calibrators and control serum 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 |
| Negative Control (NC) | < 0.150 OD450nm after blanking |
| Positive Control (PC) | > 0.500 OD450nm |

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 OD450nm > 0.100 | 1. that the Chromogen/Substrate solution has not become contaminated during the assay |
| Negative Control OD450nm > 0.150 | 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 Controls is carried out; 4. that no contamination of the Control or of the wells where it was dispensed has occurred due to spills of positive samples or Conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the Conjugate; 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed. |
| Positive Control OD450nm < 0.500 | 1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution (ex.: dispensation of a wrong Control); 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. |

Important note:

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

P. RESULTS

If the test turns out to be valid, results are calculated from the mean OD450nm/620-630nm value of the Negative Control (NC) by means of a cut-off value (Co) determined with the following formula:

$$\text{Cut-Off} = \text{NC} + 0.250$$

Important Note: When the calculation of results is performed by the operating system of an ELISA automated workstation, ensure that the proper formulation is used to generate the correct interpretation of results.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as the ratio of the Sample OD450nm/620-630nm value (S) and the Cut-Off value (Co), or S/Co, according to the following table:

| S/Co | Interpretation |
|-----------|----------------|
| < 1.0 | Negative |
| 1.0 – 1.2 | Equivocal |
| > 1.2 | Positive |

A negative result indicates that the patient has not developed IgM antibodies to EBV.

Any patient showing an equivocal result should be retested on a second sample taken 1-2 weeks after the initial sample.

A positive result is indicative of an ongoing EBV infection and therefore the patient should be treated accordingly.

Important notes:

- Ea IgM results alone are not enough to provide a clear diagnosis of EBV infection. Other tests for EBV (supplied by Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. at code n° EBNG.CE, EAG.CE, EBNM.CE, VCAG.CE, VCAM.CE and RealTime PCR assay for EBV), should be carried out.*
- Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.*
- When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.*
- Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.*

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

The following data must not be used instead of real figures obtained by the user.

Negative Control: 0.100 – 0.120 – 0.080 OD450nm

Mean Value: 0.100 OD450nm

Lower than 0.150 – Accepted

Positive Control: 1.000 OD450nm

Higher than 0.500 – Accepted

Cut-Off = 0.100 + 0.250 = 0.350

Sample 1: 0.080 OD450nm

Sample 2: 1.800 OD450nm

Sample 1 S/Co < 1.0 = negative

Sample 2 S/Co > 1.2 = positive

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 Ea 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 **diagnostic sensitivity** was studied on 88 positive samples, pre-tested 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 352 negative samples from normal individuals classified negative with the reference kit.

Moreover a panel of potentially interfering samples (RF+, unrelated virus infections, et.c) were tested with no false results. 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 IgM reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs showed in general CV% values lower than 15%, 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.

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

P. REFERENCES

- Engvall E. and Perlmann P. J.Immunochemistry 1971 : 8, 871-874.
- Engvall E. and Perlmann P. J.Immunol. 1971 : 109, 129-135.
- Remington J.S. and Klein J.O. In "Infectious diseases of the fetus and newborn infant". (1966) Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
- Volk W.A. In "Essential of Medical Microbiology". (1982) Second edition pp 729. G.B.Lippincott Co., Philadelphia, New York, S.José, Toronto.
- 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 IgM

**Ensayo inmunoenzimático para la
determinación cualitativa de anticuerpos
IgM contra el virus de Epstein-Barr
Antígeno temprano (Ea)
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

Ea IgM

A. OBJETIVO DEL EQUIPO

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

El equipo ha sido desarrollado para la clasificación del agente vírico infeccioso y para el seguimiento de pacientes infectados con EBV.

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).

Pertenece 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 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 EBV Ea nativo purificado por afinidad.

La fase sólida se trata primero con la muestra diluida y se capturan los anticuerpos IgM anti-Ea, si existen, mediante los antígenos.

Después del lavado, que elimina el resto de los componentes de la muestra, en la 2ª incubación se detectan los anticuerpos IgM anti-Ea unidos mediante la adición de anticuerpo anti hIgM, 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 IgM anti-Ea presentes en la muestra.

Las interferencias debidas a la presencia de IgG y RF en las muestras se bloquean directamente en el pocillo mediante un reactivo neutralizante.

D. COMPONENTES

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplacas: MICROPLACA

12 tiras x 8 pocillos rompibles recubiertos con Ea nativo purificado por afinidad en una bolsa sellada con desecante. Dejar la microplaca a temperatura ambiente antes de abrirla, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y conservar a 4 °C.

2. Control negativo: CONTROL-

1x4 ml. Suero humano no reactivo para anticuerpos IgM anti-Ea. Contiene 0,2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 al 0,045% como conservantes. El control negativo está codificado con el color amarillo pálido.

3. Control positivo: CONTROL+

1x4 ml. Suero humano reactivo para anticuerpos IgM anti-Ea. Contiene 0,2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 al 0,045% como conservantes. El control positivo está codificado con el color verde.

4. 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%

5. Conjugado: CONJ

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

6. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60,0 ml/vial. Solución tamponada para la dilución de las muestras. Contiene caseína al 2%, tampón Tris 0,2M a pH 6,0 +/-0,1, Tween 20 al 0,2%, ProClin 300 al 0,045% y azida sódica al 0,09% como conservantes. El componente está codificado con el color azul.

7. Reactivo neutralizante: SOLN NEUT

1x8 ml. Solución proteica para la neutralización de IgG y RF en las muestras. Contiene un detergente, estabilizantes proteicos, azida sódica al 0,1% y ProClin 300 al 0,045% como conservantes.

8. Cromógeno/Substrato: SUBS TMB

1x16 ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato-fosfato 50 mM a pH 3,5-3,8, tetra-metil-benzidina (TMB) al 0,03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0,02%.

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

9. Ácido sulfúrico: H₂SO₄ 0,3 M

1x15 ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0,3 M.

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

10. Sellador adhesivo, 2 uds.

11. Manual de instrucciones, 1 ud.

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas en el rango 10-1000 µl y puntas de plástico 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), ajustado a +37 °C.
6. Lector calibrado de micropocillos ELISA con filtros de 450 nm (lectura) y de 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 (agujas). 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.
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 a la luz del cromógeno/substrato (TMB/H₂O₂) 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. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y 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 la etiqueta externa (envase primario) y en las etiquetas internas (viales).
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 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 procedimiento de lavado, de restos de controles y muestras deben ser tratados como material potencialmente infeccioso 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 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 designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, 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. Evitar el uso de conservantes, en particular azida sódica, ya que puede afectar la actividad enzimática del conjugado.
3. Las muestras deben identificarse claramente mediante códigos de barras o nombres, a fin de evitar una interpretación errónea de los resultados. Cuando el equipo se emplea para el cribado de unidades de sangre, se recomienda el uso de código de barras y lectura electrónica.
4. Las muestras hemolizadas (color rojo) y visiblemente hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben descartarse para evitar falsos resultados, al igual que aquellas que contengan restos de fibrina, partículas pesadas o filamentos y organismos 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 partículas, 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 equipos en uso no han arrojado pérdida de actividad significativa en un período de hasta 3 meses y hasta 6 reutilizaciones.

Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Comprobar que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de conservación.

De ser así, contactar con el servicio de atención al cliente de Dia.Pro.

Las tiras de pocillos no utilizadas deben depositarse en la bolsa de aluminio otra vez con el desecante; la bolsa debe guardarse herméticamente cerrada 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 cambia de amarillo a verde.

Controles

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

Solución de lavado concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada hasta 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 durante una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

Diluyente de muestras

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

Reactivo neutralizante

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 la contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz intensa, agentes oxidantes y superficies metálicas.

En caso de que deba transferirse este componente, usar solo 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 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 o los reactivos (etanol 70%, lejía 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una exactitud de $\pm 2\%$.
- La incubadora 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 validadas para la incubación de pruebas de ELISA y se garantice una temperatura de $+37^{\circ}\text{C}$ en la microplaca.
- El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 μl /pocillo de solución de

lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.

- Los tiempos de incubación deben tener un margen de $\pm 5\%$.
- El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 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 $\geq 2,0$; c) Linealidad $\geq 2,0$; reproducibilidad $\geq 1\%$. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe calibrarse periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente debe procederse al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
- En caso de usar un sistema automatizado 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 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 de muestras y de lavado a fin de minimizar la posibilidad de obtener falsos positivos a causa de la contaminación de los pocillos adyacentes por muestras fuertemente reactivas. Se recomienda el uso de sistemas automatizados de Elisa para el cribado en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por serie.
- 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 equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos 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 están contaminados con partículas o agregados visibles.
- Asegurarse de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico.
- Comprobar que no han ocurrido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte.
- Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
- Diluir totalmente 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.

- Diluir las muestras 1:101 dispensando en un tubo desechable 1 ml de diluyente de muestras y 10 µl de muestra; mezclar con vórtex antes de usar. No diluir los controles, ya que están listos para el uso.
- Poner el número de tiras necesarias en el soporte de la microplaca. Dejar el pocillo A1 vacío para la operación de blanco. Guardar las tiras restantes en la bolsa con desecante a 2-8 °C, sellada.
- Dispensar 50 µl de reactivo neutralizante en todos los pocillos de muestras; no dispensar en el pocillo A1 ni en los pocillos de los controles.

Nota importante: El reactivo neutralizante puede bloquear falsas reacciones positivas debido a RF. Las muestras positivas en paneles de control de calidad internos podrían ser detectadas como negativas si estas muestras se analizaron como positivas con un IVD que no realiza ninguna reacción de bloqueo de RF.

- Dispensar 100 µl de control negativo por triplicado y 100 µl de control positivo una sola vez en los pocillos adecuados. A continuación, dispensar 100 µl de las muestras en los pocillos de muestras adecuados.
- Incubar la microplaca **60 min. a +37°C**.

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

- Lavar la microplaca según se indica en la sección I.3.
- Dispensar 100 µl de conjugado en todos los pocillos, excepto el A1. Comprobar que se haya añadido correctamente el reactivo. Incubar la microplaca **60 min. a +37°C**.

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

- Lavar la microplaca como se describe en la sección I.3.
- Dispensar 100 µl de cromógeno/substrato en todos los pocillos, incluido el pocillo de blanco A1. Comprobar que se haya añadido correctamente el reactivo. A continuación, incubar la microplaca a **temperatura ambiente por 20 minutos**.

Nota importante: No exponer a luz intensa directa, ya que se podría 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.
- Medir la intensidad del color con el lector de microplacas con filtro de 450 nm (lectura) y filtro de 620-630 nm (blanco, obligatorio) y leer el blanco en 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 debería hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos más de 20 minutos de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO

| | |
|---|---|
| Reactivo neutralizante (solo para muestras) | 50 µl |
| Controles | 100 µl |
| Muestras diluidas 1:101 | 100 µl |
| 1ª incubación | 60 min |
| Lavado | 5 ciclos con 20'' de remojo o 6 ciclos sin remojo |
| Temperatura | +37 °C |
| Conjugado | 100 µl |
| 2ª incubación | 60 min |
| Temperatura | +37 °C |
| Mezcla TMB/H ₂ O ₂ | 100 µl |
| 3ª incubación | 20 min |
| Lavado | 5 ciclos con 20'' de remojo o 6 ciclos sin remojo |
| Temperatura | t.a. |
| Ácido sulfúrico | 100 µl |
| Lectura DO | 450 nm/620-630nm nm |

A continuación se incluye un ejemplo del esquema de dispensado:

| | | Microplaca | | | | | | | | | | | |
|---|----|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | BL | M4 | | | | | | | | | | | |
| B | CN | M5 | | | | | | | | | | | |
| C | CN | M6 | | | | | | | | | | | |
| D | CN | M7 | | | | | | | | | | | |
| E | CP | M8 | | | | | | | | | | | |
| F | M1 | M9 | | | | | | | | | | | |
| G | M2 | M10 | | | | | | | | | | | |
| H | M3 | M11 | | | | | | | | | | | |

Leyenda: BL = Blanco // CN = Control Negativo
CP = Control Positivo // M = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Se realiza una comprobación para validar los calibradores y el suero de control siempre que se utiliza el equipo, para verificar si el rendimiento del ensayo es el homologado.

Controlar que los datos siguientes coincidan:

| Parámetros | Requisitos |
|-----------------------|---|
| Pocillo blanco | < 0,100 DO 450 nm |
| Control negativo (CN) | < 0,150 DO 450 nm después de leer el blanco |
| Control positivo (PC) | > 0,500 DO450nm |

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

En caso contrario, detener el ensayo y comprobar lo siguiente:

| Problema | Comprobar |
|--|---|
| Pocillo blanco > 0,100 DO 450 nm | 1. la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo. |
| Control negativo DO 450 nm > 0,150 | 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 del ensayo al dispensar los controles; 4. el control o los pocillos en los que se ha dispensado no se han contaminado debido a derrames de muestras positivas o conjugado; 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado; 6. las agujas del lavador no están parcial o totalmente obstruidas. |
| Control positivo DO 450 nm < 0,500 | 1. el procedimiento ha sido realizado correctamente; 2. no ha habido errores durante su distribución (ejemplo, dispensación de un control incorrecto); 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. |

Nota importante:

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

P. RESULTADOS

Si la prueba es válida, los resultados se calculan a partir del valor medio de DO 450 nm / 620-630 nm del control negativo (CN), mediante un valor de corte (Co) determinado con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de corte} = \text{CN} + 0,250$$

Nota importante: Cuando el cálculo de los resultados se realiza mediante el sistema operativo de un equipo ELISA automático, hay que asegurarse de que la formulación usada para la interpretación de los resultados sea correcta.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación de los resultados se realiza mediante la relación entre el valor de DO 450 nm / 620-630 nm de la muestra (M) y el valor de corte (Co), o M/Co. Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

| M/Co | Interpretación |
|-----------|----------------|
| < 1,0 | Negativo |
| 1,0 – 1,2 | Equívoco |
| > 1,2 | Positivo |

Un resultado negativo indica que el paciente no ha desarrollado anticuerpos IgM frente a EBV.

Los pacientes cuya muestra resulte no concluyente deben someterse a una nueva prueba con una segunda muestra tomada 1 o 2 semanas después de la inicial. Un resultado positivo es indicativo de infección en curso por EBV y por consiguiente el paciente debe ser tratado adecuadamente.

Notas importantes:

1. Los resultados de la prueba Ea IgM por sí solos no son suficientes para establecer un diagnóstico claro de infección por EBV. Deben realizarse otras pruebas de detección de EBV (suministradas por Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. con código n.º EBNG.CE, EAG.CE, EBNM.CE, VCAG.CE, VCAM.CE y RealTime PCR assay for EBV).
2. 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.
3. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
4. El diagnóstico debe ser realizado y comunicado al paciente por un médico calificado.

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

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

Control negativo: 0,100 – 0,120 – 0,080 DO 450 nm
 Valor medio: 0,100 DO 450 nm
 Menor de 0,150 – Válido
 Control positivo: 1,000 DO 450 nm
 Mayor de 0,500 – Válido
 Valor de corte = 0,100+0,250 = 0,350
 Muestra 1: 0,080 DO 450 nm
 Muestra 2: 1,800 DO 450 nm
 Muestra 1 M/Co < 1,0 = negativa
 Muestra 2 M/Co > 1,2 = positiva

R. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

La evaluación del rendimiento se ha realizado en un centro clínico externo en paneles de muestras positivas y negativas con respecto a un equipo de referencia.

1. Límite de detección

La Comunidad Europea no ha definido ningún estándar internacional para la prueba de detección de anticuerpos Ea IgM 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 en fase aguda de mononucleosis infecciosa.

2. Sensibilidad y especificidad diagnóstica:

La **sensibilidad diagnóstica** se ha estudiado en 88 muestras positivas previamente analizadas con el equipo de referencia europeo que se utiliza en el laboratorio. Se recogieron muestras positivas de pacientes con mononucleosis infecciosa aguda.

La **especificidad diagnóstica** ha sido determinada en 352 muestras negativas de individuos sanos clasificadas como negativas mediante un equipo de referencia.

Asimismo se ha analizado un panel de muestras potencialmente interferentes (RF+, infecciones no relacionadas con el virus, etc.) sin que se obtuvieran resultados falsos.

Se emplearon además plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrato, EDTA y heparina) y suero humano 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 IgM, examinadas en 16 réplicas en tres tandas separadas, presentaron valores CV% inferiores al 15% en general, dependiendo de las lecturas de DO 450 nm / 620-630 nm.

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

S. LIMITACIONES

Los falsos positivos fueron estimados como menos del 2% de la población normal, debido principalmente a altos títulos de Factor Reumatoide.

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

P. BIBLIOGRAFÍA

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

Todos los productos 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



