

EBV VCA IgA

**Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for
the determination of IgA antibodies
to Epstein Barr Virus Capsidic Antigen
in human serum and plasma**



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

VCA IgA

A. INTENDED USE

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

B. INTRODUCTION

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

C. PRINCIPLE OF THE TEST

In order to get rid of cross-reactions with other viruses of the same family, microplates are coated with purified VCA antigen, bearing immunodominant and specific sequences capable to provide the assay with the highest specificity and sensitivity.

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

After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti VCA IgA are detected by the addition of anti hIgA antibody, labeled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti VCA IgA antibodies present in the sample.

Interferences due to the presence of IgG to VCA are blocked directly in the well by the addition of anti hIgG adsorbent.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 microwells coated with purified VCA antigen. Plates are sealed into a bag with desiccant.

Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

2. Negative Control: CONTROL -

1x4.0 ml/vial. Ready to use. It contains, human IgA antibodies negative to VCA, 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.

The Negative Control is pale yellow color coded.

3. Positive Control: CONTROL +

1x4.0 ml/vial. Ready to use. It contains human IgA antibodies positive to VCA, 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.

The Positive Control is green yellow color coded.

4. 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.

5. Enzyme conjugate: CONJ

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

6. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

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

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

7. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vialIt contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

8. 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.

9. Neutralizing Reagent: SOLN NEUT

1x8ml/vial. Ready-to-use Reagent. It contains goat anti hIgG, 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.

10. Plate sealing foils n°2

11. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.

2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National

Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

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

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by 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 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

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 in storage. In this case call Dia.Pro's customer service. Unused strips have to be placed back into the aluminium pouch, in presence of desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°..8°C. When opened the first time, residual strips are stable till the indicator of humidity inside the desiccant bag turns from yellow to green.

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

Controls:

Ready to use. Mix gently on vortex before use. Do not dilute !

Sample Diluent:

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

Neutralizing Reagent:

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.
 1. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturer's instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
 7. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
 8. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
 9. Check that the micropipettes are set to the required volume.
 10. Check that all the other equipment is available and ready to use.
 11. 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 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute Controls as they 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 empty for the operation of blanking.
3. Dispense 50 µl of the Neutralizing Reagent (SOLN NTR) in all the wells of the samples. Do not add it in the wells used for Controls !

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. Then dispense 100 µl of Negative Control in triplicate and 100 µl of Positive Control in single. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
5. 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.*

6. Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section I.3).
7. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except A1 blank 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.

8. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
9. Wash microwells as reported previously (section I.3).
10. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank wells A1 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.

11. 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 Control and the positive samples from blue to yellow.
12. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

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

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Neutralizing Reagent (only for samples)	50 µl
Controls	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H2O2	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 µl
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	S5										
B	NC	S6										
C	NC	S7										
D	NC	S8										
E	PC	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control
PC = Positive Control 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
Negative Control	≤ 0.150 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
Positive Control	OD450nm > 1.000

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

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

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not got contaminated during the assay
Negative Control > 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 the positive control instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative control 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.
Positive Control ≤ 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of the negative control 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 12.

P. RESULTS

Calculate the mean OD450nm/620-630nm values for the Negative Control (NC) and then apply the following formula to calculate the Cut-Off:

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

Then calculate the ratio between the OD450nm/620-630nm of samples and the Cut-Off value, currently defined as S/Co.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Samples with a S/Co value < 1 are considered negative for anti VCA IgA antibody.

Samples with a S/Co value > 1 are considered positive for anti VCA IgA antibody.

Important notes:

1. *VCA IgA results alone are not enough to provide a clear diagnosis, in particular for NPC. Other confirmation tests and clinical analysis have to be carried out.*
2. *Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.*
3. *When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.*
4. *Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.*

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The diagnostic sensitivity was studied on more than 50 samples, pre-tested positive with the reference kit of European origin in use at the laboratory. Positive samples were collected from patients undergoing acute mononucleosis infection. A value of sensitivity of 100% was assessed.

The diagnostic specificity was determined on panels of more than 50 negative samples from normal individuals and blood donors, classified negative with the reference kit, including potentially interfering specimens. A value of specificity of 100% was assessed.

No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed. Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine possible interferences. 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.

3. Reproducibility:

Data obtained from a study conducted on three samples of different VCA IgA reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs showed CV% results ranging 2-8%, depending on the OD450nm/620-630nm readings.

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

S. LIMITATIONS

False positivity has been assessed as less than 2% of the normal population.

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

Crossreactions with other correlated viruses have been observed in less than 2% of positive samples.

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 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 Srl
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italy



EBV VCA IgA

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la
determinación de anticuerpos IgA contra
el antígeno de cápside 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

REF. VCAA.CE
96 pruebas

VCA IgA

A. OBJETIVO DEL EQUIPO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cuantitativa/cualitativa de anticuerpos IgA contra el antígeno de cápside 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 pueden desarrollar 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 (principalmente antígeno nuclear o EBNA y antígeno de cápside viral o VCA) constituye un medio importante y útil de control y seguimiento de los pacientes infectados por EBV.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

Para evitar reacciones cruzadas con otros virus de la misma familia, se han recubierto las microplacas con antígeno VCA purificado, con secuencias inmunodominantes y específicas capaces de proporcionar al ensayo la mayor especificidad y sensibilidad.

En la 1ª incubación, la fase sólida se trata con muestras diluidas y los antígenos capturan las IgG anti-VCA, si las hay.

Después del lavado, que elimina el resto de los componentes de la muestra, las IgA anti-VCA unidas en la 2ª incubación se detectan mediante la adición de anticuerpo anti-hIgA, 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 IgA anti-VCA presentes en la muestra.

Las interferencias debidas a la presencia de IgG frente al VCA se bloquean directamente en el pocillo mediante la adición de absorbente anti-hIgG.

D. COMPONENTES

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLACA

12 tiras de 8 micropocillos recubiertos con antígeno VCA purificado. Las placas están 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 -

1x4,0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene anticuerpos IgA humanos negativos a VCA, 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 al 0,045% como conservantes.

El control negativo está codificado con el color amarillo pálido.

3. Control positivo: CONTROL +

1x4,0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene anticuerpos IgA humanos positivos a VCA, 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 al 0,045% como conservantes. El control positivo está codificado con el color verde-amarillo.

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, 0,05% de Tween 20 y ProClin 300 al 0,045%.

5. Conjugado enzimático: CONJ

1x16 ml/vial. Listo para el uso y codificado con color rojo. Contiene anticuerpos policlonales anti-IgA humana conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), 5% de albúmina de suero bovino, 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. Cromógeno/Sustrato: SUBS TMB

1x16 ml/vial. Contiene tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 3,5-3,8, dimetilsulfóxido al 4%, 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.

7. Ácido sulfúrico: H2SO4 0,3 M

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

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

8. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60ml/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 al 0,045% como conservantes. Utilizar para diluir la muestra.

9. Reactivo neutralizante: SOLN NEUT

1x8 ml/vial. Reactivo listo para el uso. Contiene anti-hIgG de cabra, 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 al 0,045% como conservantes.

10. Sellador adhesivo n.º 2

11. Manual de instrucciones n.º 1

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 los oxidantes químicos usados como desinfectantes)
3. Temporizador 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 (agujas). Todo el personal involucrado debe tener formación en procedimientos de bioseguridad, como recomienda el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, 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 que son 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 limpios 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 la contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar la 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 ninguna pérdida relevante de actividad hasta 6 usos del dispositivo y hasta 3 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben manipularse de acuerdo con el nivel 2 de bioseguridad, según ha recomendado el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, EE.UU., y publicado 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 la contaminación cruzada.
Los desechos producidos durante el uso del equipo deben eliminarse 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 de muestras deben tratarse como potencialmente infecciosos e inactivarse antes de su eliminación. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% durante 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 empapado en lejía y, posteriormente, en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Los demás materiales de desecho que se generan durante la utilización del equipo (por ejemplo, puntas usadas en las muestras y controles, microplacas usadas) deben manipularse como si se tratase de fuentes potenciales de infección y deben eliminarse de acuerdo con las directivas nacionales y las leyes relativas al tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o el 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 descartarse 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 agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES

Microplaca:

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 guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8 °C. Cuando se abre por primera vez, las tiras sobrantes se mantienen estables hasta que el indicador de humedad incluido en la bolsa del desecante cambia de amarillo a verde.

Solución de lavado concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse 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 1 semana a temperaturas entre 2 y 8 °C.

Conjugado enzimático:

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 solo 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, los agentes oxidantes y las superficies metálicas.
En caso de que deba transferirse el componente, usar solo contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Controles:

Listo para el uso. Mezclar suavemente en un vórtex antes de usar. ¡No diluir!

Diluyente de muestras:

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

Reactivo neutralizante:

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

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 someterse a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol doméstico, lejía al 10% y desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una exactitud 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 homologadas para la incubación de pruebas 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 una tolerancia 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 absorbencia de 0 a ≥ 2,0; c) linealidad ≥ 2,0; reproducibilidad ≥ 1%. La lectura del blanco se lleva a cabo 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 (dispensación, incubación, lavado, lectura y procesamiento de datos) deben establecerse, calibrarse y controlarse con atención, además de ajustarse periódicamente, 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 corroborarse tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe homologarse y configurarse correctamente. Debe prestarse especial atención para evitar el arrastre causado por las agujas de dispensación y de lavado a fin de minimizar la posibilidad de contaminar los 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 instalar los nuevos instrumentos que se van a usar con el equipo.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la parte externa del equipo (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas o agregados visibles.
3. Comprobar que el cromógeno (TMB) sea incoloro o azul pálido aspirando un pequeño volumen con una pipeta estéril de plástico.
4. Comprobar que no se hayan producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte (envase principal). Comprobar que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté perforada ni dañada.
5. Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20x como se ha descrito anteriormente.
6. Dejar los componentes restantes hasta que alcancen la temperatura ambiente (aprox. 1 hora) y luego mezclar suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
7. Ajustar la incubadora ELISA a 37 °C y cargar el lavador ELISA con la solución de lavado diluida según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
8. Comprobar que el lector ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
9. En caso de usar un equipo automatizado, encender el equipo y comprobar que se están usando los protocolos de ensayo adecuados.
10. Comprobar que las micropipetas estén ajustadas en el volumen requerido.
11. Asegurarse de que el resto del equipamiento esté disponible y listo para el uso.
12. 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.

1. Diluir las muestras en una proporción 1:101 en un tubo de dilución adecuadamente definido (ejemplo, 1000 µl de diluyente de muestras + 10 µl de muestra). No diluir los controles, ya que están listos para el uso. Mezclar cuidadosamente todos los componentes líquidos en un vórtex y después proceder como se describe a continuación.
2. Poner el número de micropocillos necesarios en el soporte. Dejar el A1 vacío para la operación de lectura del blanco.
3. Dispensar 50 µl de reactivo neutralizante (SOLN NTR) en todos los pocillos de muestras. ¡No añadirlo a los pocillos usados para 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.

4. Dispensar 100 µl de control negativo por triplicado y 100 µl de control positivo una sola vez. A continuación, dispensar 100 µl de muestras diluidas en cada pocillo adecuadamente identificado.
5. 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 empleen equipos automatizados ELISA.

6. Lavar la microplaca con el lavador automático como se indica anteriormente (sección I.3).

7. Dispensar 100 µl de conjugado en cada pocillo con la pipeta, excepto en el pocillo de blanco 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.

8. Incubar la microplaca durante **60 min. a +37 °C**.
9. Lavar los micropocillos como se indica anteriormente (sección I.3).
10. Dispensar 100 µl de mezcla de cromógeno/substrato con la pipeta en todos los pocillos, incluidos los pocillos de blanco A1. 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 una actividad de fondo excesiva.

11. Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico con la pipeta para detener la reacción enzimática en todos los pocillos usando la misma secuencia que en el paso 9. La adición del ácido cambia el color del control positivo y las muestras positivas de azul a amarillo.
12. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se describe en la sección I.5, con 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:

1. Asegurarse de que no haya huellas dactilares en el fondo de los pocillos antes de la lectura. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de interrupción y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos desde su adición. Se podría producir autooxidación del cromógeno causando una elevada actividad de fondo.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO

Método	Operaciones
Reactivo neutralizante (solo para muestras)	50 µl
Controles	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	5 ciclos con 20" de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado enzimático	100 µl
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	5 ciclos con 20" de remojo o 6 ciclos sin remojo
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3ª incubación	20 min
Temperatura	t.a.
Ácido sulfúrico	100 µl
Lectura DO	450 nm/620-630nm

A continuación se incluye un ejemplo del esquema de dispensación:

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 controles siempre que se utiliza el equipo, para verificar si el rendimiento del ensayo es el idóneo.

Controlar que los datos siguientes coinciden:

Comprobar	Requisitos
Pocillo de blanco	Valor $< 0,100$ DO 450 nm
Control negativo	Valor medio $\leq 0,150$ DO 450 nm después de leer el blanco Coeficiente de variación $< 30\%$
Control positivo	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
Pocillo de blanco $\geq 0,100$ DO 450 nm	1. La solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
Control negativo $> 0,150$ 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 de idoneidad previos. 2. Se ha usado la solución de lavado apropiada y se ha cargado en el lavador antes del uso. 3. No se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo). 4. No ha existido contaminación del control 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 parcial o totalmente obstruidas.
Control positivo $\leq 1,000$ DO 450 nm	1. El procedimiento se ha ejecutado correctamente. 2. No se han cometido errores en su distribución (dispensar el control negativo en su lugar). 3. El proceso de lavado y los parámetros del lavador coinciden con los validados en los estudios de idoneidad previos. 4. No ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

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

Nota importante:

El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 12.

P. RESULTADOS

Calcular los valores medios de DO 450 nm /620-630 nm para el control negativo (CN) y después aplicar la fórmula siguiente para calcular el valor de corte:

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

A continuación, calcular la relación entre el valor DO 450 nm / 620-630 nm de las muestras y el valor de corte, que se define como M/Co.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las muestras con un valor M/Co < 1 se consideran negativas para anticuerpos anti-VCA IgA .

Las muestras con un valor M/Co > 1 se consideran positivas para anticuerpos anti-VCA IgA.

Notas importantes:

1. Los resultados de la prueba VCA IgA por sí solos no son suficientes para establecer un diagnóstico claro, especialmente para CNF. Deberán realizarse otras pruebas de confirmación y análisis clínicos.
2. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de opinión e interpretación.
3. Cuando se transmiten los resultados de la prueba del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar la transferencia de datos erróneos.
4. Un médico cualificado debe hacer el diagnóstico e informar al paciente.

2. Sensibilidad y especificidad diagnóstica:

La sensibilidad diagnóstica se estudió en más de 50 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. El valor de sensibilidad fue del 100%.

La especificidad clínica se determinó utilizando paneles de más de 50 muestras negativas, provenientes de individuos sanos y donantes de sangre, clasificadas como negativas mediante el equipo de referencia, incluidas muestras potencialmente interferentes. El valor de especificidad fue del 100%.

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

3. Reproducibilidad:

Los datos obtenidos en un estudio realizado en tres muestras de diferente reactividad VCA IgA, examinadas en 16 réplicas y tres tandas separadas, presentaron valores CV% del 2-8%, 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

Se determinaron falsos positivos en menos del 2% de la población normal.

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

Se han observado reacciones cruzadas con otros virus relacionados en menos del 2% de muestras positivas.

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 ISO 13485. Cada lote se somete a 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



