

NovaLisa™

Epstein-Barr Virus (VCA)

IgM – ELISA



Enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM-class antibodies against Epstein-Barr Virus in human serum or plasma

Enzymimmunoassay zur qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen das Epstein-Barr-Virus (VCA) in Humanserum oder Plasma

Enzyme immunoassay pour la détermination qualitative des anticorps IgM contre Epstein-Barr virus en sérum humain ou plasma

Test immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi della classe IgM per Virus d'Epstein-Barr nel siero o plasma umano

Enzimoinmunoensayo para la determinación cualitativa de los anticuerpos IgM contra el virus Epstein-Barr (ACV) en suero o plasma humano

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 6
Deutsch:	Seite	7 bis 12
Français:	Page	13 à 18
Italiano:	da Pagina	19 a 23
Espanol:	Página	24 a 29

For further languages please contact our authorized distributors.

Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografía / Bibliografía	Page / Seite / Page / Pagina / Página	30
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des symboles / Legenda / Símbolos	Page / Seite / Page / Pagina / Página	31
Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung Testdurchführung/ Résumé de la procédure de test/ Schema della procedura/ Resumen de la técnica	Page / Seite / Page/ / Pagina / Página	32

1. INTRODUCTION

Epstein-Barr Virus (EBV) is a member of the herpesvirus family (Gamma subgroup, DNA virus of 120-200 nm) and one of the most common human viruses. The virus occurs worldwide, and most people become infected with EBV sometime during their lives. Transmission of the virus is almost impossible to prevent since many healthy people can carry and spread the virus intermittently for life. Infants become susceptible to EBV as soon as maternal antibody protection disappears. Infection of children usually causes no symptoms. Infection during adolescence or young adulthood causes infectious mononucleosis 35% to 50% of the time. Infectious mononucleosis is almost never fatal. There are no known associations between active EBV infection and problems during pregnancy, such as miscarriages or birth defects. Although the symptoms of infectious mononucleosis usually resolve in 1 or 2 months, EBV remains dormant or latent in a few cells in the throat and blood for the rest of the person's life. Periodically, the virus can reactivate and is commonly found in the saliva of infected persons. This reactivation usually occurs without symptoms of illness. EBV also establishes a lifelong dormant infection in some cells of the body's immune system. A late event in a very few carriers of this virus is the emergence of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma, but EBV is probably not the sole cause of these malignancies.

Species	Disease	Symptoms	Mechanism of Infection
Epstein-Barr Virus	infectious mononucleosis	fever, sore throat, swollen lymph glands	Person to Person Transmission EBV requires intimate contact with the saliva of an infected person, but the virus is also found in the saliva of healthy people

The presence of virus resp. infection may be identified by

- PCR
- Serology: "mono spot" test, Detection of antibodies by ELISA

The optimal combination of serologic testing consists of the titration of four markers: IgM and IgG to the viral capsid antigen (VCA), IgM to the early antigen, and antibody to EBV nuclear antigen (EBNA). IgM to VCA appears early in infection and disappears within 4 to 12 weeks. IgG to VCA appears in the acute phase, peaks at 2 to 4 weeks after onset, declines slightly, and then persists for life. If antibodies to the viral capsid antigen are not detected, the patient is susceptible to EBV infection.

2. INTENDED USE

The NovaTec Epstein-Barr Virus (EBV) IgM-ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against Epstein-Barr virus **viral capsid antigen (VCA)** in human serum or plasma (citrate).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of IgM-class antibodies against Epstein-Barr Virus is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are precoated with Epstein-Barr Virus antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-human IgM conjugate is added. This conjugate binds to the captured Epstein-Barr Virus-specific antibodies. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine- (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of Epstein-Barr Virus-specific IgM antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Epstein-Barr Virus Coated Wells (IgM):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with Epstein-Barr Virus antigen; in resealable aluminium foil.
- **IgM Sample Diluent ***:** 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; containing antihuman-IgG; pH 7.2 ± 0.2; coloured green; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.
- **Epstein-Barr Virus anti-IgM Conjugate**:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled rabbit antibody to human IgM; coloured red, ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
- **Epstein-Barr Virus IgM Positive Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- **Epstein-Barr-Virus IgM Cut-off Control***:** 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.

- **Epstein-Barr Virus IgM Negative Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.

* contains 0.1 % Bronidox L after dilution

** contains 0.2 % Bronidox L

*** contains 0.1 % Kathon

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature (20...25°C) before starting the test run!

6.1. Coated snap-off Strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with Epstein-Barr Virus antigen. Store at 2...8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

6.2. Epstein-Barr Virus anti-IgM Conjugate

The bottle contains 20 ml of a solution with anti-human-IgM horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert red dye. The solution is ready to use. Store at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.3. Controls

The bottles labelled with Positive, Cut-off and Negative Control contain a ready to use control solution. It contains 0.1% Kathon and has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.4. IgM Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, anti human-IgG, stabilizers, preservatives and an inert green dye. It is used for the dilution of the patient specimen. The solution contains antihuman IgG class antibodies to eliminate competitive inhibition from specific IgG class antibody to remove rheumatoid factor. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.5. Washing Solution (20xconc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute washing solution 1+19; e.g. 10 ml washing solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer will keep for 5 days if stored at room temperature. *Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date.*

6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C, away from the light. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date.*

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2...8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 to -70°C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.*
Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgM Sample Diluent. Dispense 10µl sample and 1 ml IgM Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank,
1 well	(e.g. B1)	for the negative control,
2 wells	(e.g. C1+D1)	for the cut-off control and
1 well	(e.g. E1)	for the positive control.

It is recommended to determine controls and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 100µl controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37±1°C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl of Washing Solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.
5. Dispense 100µl Epstein-Barr Virus anti-IgM Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature. Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.

Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with physiological sodium chloride solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with dilution buffer and multiply the results in NTU by 2.

11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value < **0.100**.
- **Negative control** in B1: Absorbance value < **0.200 and < cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.30**.
- **Positive control** in E1: Absorbance value > **cut-off**.

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off control 0.39 + absorbance value Cut-off control 0.37 = 0.76 / 2 = 0.38

$$\text{Cut-off} = 0.38$$

9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 10% over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 10% above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative

→ **grey zone**

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

9.3.1. Results in NovaTec Units

$$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec-Units} = \text{NTU}]$$

Example: $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-off:	10	NTU
Grey zone:	9-11	NTU
Negative:	<9	NTU
Positive:	>11	NTU

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

Interassay	n	Mean	Cv (%)
Pos. Serum	24	1.37	6.9
Intraassay	n	Mean	Cv (%)
Pos. Serum	25	1.32	5.1

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 96.3 %.

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 93.9 %.

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.2 mg/ml bilirubin.

Panel Prof. Krech/Frauenfeld/Swiss

10.5. Cross-Reactivity

<u>Acute Infection</u>	<u>NovaTec EBV IgM ELISA</u>
Adenovirus	neg.
CMV	neg.
Echinococcus	neg.
HBV	neg.
Influenza A	neg.
Influenza B	neg.
Leptospira	neg.
Picorna	neg.
Q-Fever	neg.
Rubella	neg.
Toxoplasma	neg.
VZV	neg.
Lues	neg.
RSV	neg.

Note: The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaLisa™ ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING: In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!

WARNING: Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: EBVM0150 Epstein-Barr Virus (VCA) IgM-ELISA (96 Determinations)

1. EINLEITUNG

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist der Erreger der infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber) und spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung maligner Erkrankungen, wie dem Burkitt-Lymphom, dem Nasopharynx-Karzinom und verschiedenen lymphoproliferativen Syndromen. Es gehört zu den Gamma-Herpes-Viren und ist mit einer Lipidhülle versehen. Infiziert werden Zellen, die den Komplementrezeptor 2 (CR-2=CD21) tragen (z.B. B-Lymphozyten). Das virale Genom besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA, die für mehrere Proteine kodiert.

Nach initialer Replikation in undifferenzierten Zellen des Rachens und Zungenrandes infiziert das Virus gewebsinfiltrierende B-Lymphozyten in der Speicheldrüse. Durch Immortalisation wird die infizierte B-Zelle klonal expandiert. Die meisten dieser Zellen werden von zytotoxischen T-Lymphozyten eliminiert, in den wenigen überlebenden Zellen kann jedoch eine latente Infektion etabliert werden. Diese Zellen werden nicht vom Immunsystem erkannt und können nach immunologischer Stimulation erneut infektiöse Viruspartikel produzieren.

Wie alle Herpesviren ist EBV ubiquitär verbreitet und infiziert seinen Wirt persistent. Es wird über den Speichel ausgeschieden und auch übertragen. Der hauptsächliche Übertragungsmodus liegt im Küssen, weshalb der mit der Primärinfektion auftretenden Mononukleose auch der Name „kissing disease“ gegeben wurde. In den Industrienationen erreicht die Durchseuchung bis zum 15. Lebensjahr etwa 40 %, um dann steil auf 80-90 % im Erwachsenenalter anzusteigen. In den Entwicklungsländern beträgt die Durchseuchung aufgrund der niedrigeren Hygienestandards schon bei den unter 3-jährigen nahezu 100 %. Iatrogene Übertragungen durch Transplantationen wurden beschrieben. Die Mehrzahl der Infektionen verläuft asymptomatisch.

Spezies	Erkrankung	Übertragungsweg	Symptome	Komplikationen	Diagnostik
Epstein-Barr-Virus	Infektiöse Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber, kissing disease)	Speichel, Tröpfcheninfektion	Pharyngitis, Kopfschmerzen, Fieber, Enanthem, Lymphknotenschwellung Tonsillitis mit weißlichen Belägen, seltener Hepatosplenomegalie	Meningitis, Enzephalitis, Arzneimittel-exanthem	Serologie PCR

Nachweis:

- PCR
- Serologie: „mono-spot“ Test, Antikörpernachweis mittels ELISA

Die serologische Diagnostik nutzt die Induktion der Immunglobulin Antwort gegen verschiedene EBV Antigene: Anti-VCA IgM und Anti-VCA IgG (VCA= viral capsid antigen), Anti-EA IgM (EA= early antigen) und Anti-EBNA Antikörper (EBNA = Epstein-Barr-Virus nuclear antigen). Bei der akuten Infektion treten Anti-VCA IgM und IgG auf, eine Reaktivierung lässt sich über ein Ansteigen der VCA IgG Werte erkennen. Fehlen Antikörper gegen das virale Kapsid ist der Patient empfänglich für EBV Infektionen.

2. VERWENDUNGSZWECK

Der NovaTec Epstein-Barr-Virus (VCA) IgM-ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen das Epstein-Barr-Virus in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen IgM-Antikörpern gegen das Epstein-Barr-Virus (VCA) beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik.

Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit inaktivierten EBV spezifischen viralen Kapsid-Antigenen (p 18). Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierte anti-human-IgM Antikörper binden an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB) -Substrat nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Epstein-Barr-Virus beschichtete Mikrotiterstreifen (IgM):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit inaktivierten Epstein-Barr-Virus Kapsid-Antigenen (p 18); in wiederverschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgM-Probenverdünnungspuffer***:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; enthält anti-human-IgG-Antikörper; pH 7.2 ± 0.2; grün gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml Schwefelsäure, 0.2 mol/l; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.

- **Waschlösung (20x konz.):*** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.
- **Epstein-Barr-Virus anti-IgM-Konjugat**:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörper gegen humanes IgM; rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Epstein-Barr-Virus IgM Positiv-Kontrolle***:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Epstein-Barr-Virus IgM Cut-off Kontrolle***:** 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Epstein-Barr-Virus IgM Negativ-Kontrolle***:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

* enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung

** enthält 0.2 % Bronidox L

*** enthält 0.1 % Kathon

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25°C) zu bringen!

6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktiviertem, rekombinantem Epstein-Barr-Virus Antigen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. . Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

6.2. Epstein-Barr-Virus anti-IgM-Konjugat

Die Flasche enthält 20 ml einer Lösung von anti-human IgM-Meerrettichperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten roten Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.3. Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8°C aufzubewahren und enthalten 0.1 % Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.4. IgM-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten grünem Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung enthält anti-human-IgG-Antikörper, um den Proben spezifische IgG-Anteile sowie IgG-gebundene Rheumafaktoren zu entziehen. Sie wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt und ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.6. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum Verfallsdatum bei sachgerechter Lagerung von 2...8°C.*

6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8°C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70...-20°C). Wiederaufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!*
Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit IgM-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10µl Probe und 1 ml IgM-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

1 Vertiefung	(z.B. A1)	für den Substratleerwert (Blank),
1 Vertiefungen	(z.B. B1)	für die Negativ Kontrolle und
2 Vertiefungen	(z.B. C1+D1)	für die Cut-off Kontrolle und
1 Vertiefung	(z.B. E1)	für die Positiv Kontrolle vorsehen

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ einstellen.

1. Je 100 µl Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!

5. 100µl Epstein-Barr-Virus anti-IgM Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*

Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit physiologischer

Kochsalzlösung 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit IgM-Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in NTU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.

11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in A1 den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion < **0,100**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion < **0,200** und < **cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionswerte **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionswerte > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

Beispiel: $0.37 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0.39 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0.76 : 2 = \underline{0.38}$

Cut-off = 0.38

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 10 % über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**

Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % unterhalb des Cut-Offs liegt.

9.3.1. Ergebnisse in NovaTec-Einheiten [NTU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{NovaTec-Einheiten} = \text{NTU}]$

Beispiel: $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off :	10	NTU
Grauzone:	9-11	NTU
Negativ:	<9	NTU
Positiv:	>11	NTU

10. TESTMERKMALE

10.1. Präzision

Interassay	n	Mittelwert	Vk (%)
Pos. Serum	24	1.37	6.9
Intraassay	n	Mittelwert	Vk (%)
Pos. Serum	25	1.32	5.1

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 96.3%.

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 93.9%.

10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,2 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

10.5. Kreuzreaktivität

Panel Prof. Krech/Frauenfeld/Swiss

<u>Akute Infektion</u>	<u>NovaTec EBV IgM ELISA</u>
Adenovirus	neg.
CMV	neg.
Echinococcus	neg.
HBV	neg.
Influenza A	neg.
Influenza B	neg.
Leptospira	neg.
Picornia	neg.
Q-Fever	neg.
Rubella	neg.
Toxoplasma	neg.
VZV	neg.
Lues	neg.
RSV	neg.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der NovaLisa™ ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG: Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.

WARNUNG: Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

14. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: EBVM0150 Epstein-Barr-Virus (VCA) IgM-ELISA (96 Bestimmungen)

1. INTRODUCTION

Le virus d'Epstein-Barr est un membre de la famille des Herpes virus (sous-groupe gamma, virus à ADN de 120-200 nm) et il est un des virus humains les plus communs. Le virus est présent dans le monde entier, et la plupart des personnes sont su jour infectées par le virus d'Epstein-Barr un jour. La transmission du virus est presque impossible à enrayer puisque beaucoup de personnes en bonne santé peuvent être porteuses du virus et donc être contagieuses de manière intermittente. Les enfants en bas âge deviennent susceptibles de contracter une infection par le virus d'Epstein-Barr dès que la protection par les anticorps maternels disparaît. En général, l'infection des enfants ne cause aucun symptôme. L'infection pendant l'adolescence ou le jeune âge adulte est responsable de mononucléoses infectieuses dans 35% à 50% des cas.

La mononucléose infectieuse n'est presque jamais mortelle. Il n'y a aucune association connue entre l'infection active par le virus d'Epstein-Barr et les problèmes actifs pendant la grossesse, telle que des fausses couches ou des problèmes de naissance. Bien que les symptômes de la mononucléose infectieuse disparaissent habituellement en 1 ou 2 mois, le virus d'Epstein-Barr demeure dormant ou latent à vie dans certaines cellules de la gorge et du sang des personnes infectées. De façon épisodique, le virus peut se réactiver et il est généralement trouvé dans la salive des personnes infectées. En général, cette réactivation se produit sans symptômes de la maladie. Le virus d'Epstein-Barr établit également une infection dormante perpétuelle dans quelques cellules du système immunitaire du porteur.

L'apparition d'un lymphome de Burkitt et d'un carcinome nasopharyngien peut se produire même après des années, mais le virus d'Epstein-Barr n'est probablement pas la cause unique de ces malignités.

Espèce	La maladie	Symptômes	Mécanisme de l'infection
Virus d'Epstein-Barr	mononucléose infectieuse	fièvre, gorge endolorie, ganglion lymphatique gonflé	transmission de personne à personne l'infection par le virus d'Epstein-Barr exige un contact intime avec la salive d'une personne infectée, mais le virus peut également être trouvé dans la salive des personnes en bonne santé

La présence d'une infection peut être identifiée par

- PCR
- Sérologie : test "mono spot", détection des anticorps par ELISA

La combinaison optimale du test sérologique comprend la titrage de quatre marqueurs : les IgM et IgG dirigées contre l'antigène viral de capsid (VCA), les IgM dirigées contre l'antigène précoce (EA), et les anticorps dirigées contre l'antigène nucléaire du virus d'Epstein-Barr (EBNA). Les IgM anti-VCA apparaissent tôt dans l'infection et disparaissent dans un délai de 4 à 12 semaines. Les IgG anti-VCA apparaissent dans la phase aiguë, pour atteindre un pic 2 à 4 semaines après le début de l'infection, et déclinent légèrement, puis persistent pendant toute la vie.

Si les anticorps dirigés contre l'antigène viral de capsid ne sont pas détectés, le patient est susceptible de contracter une infection par le virus d'Epstein-Barr.

2. UTILISATION PRÉVUE

L'ELISA d'IgM d'Epstein-Barr virus (EBV) de NovaTec est prévu pour la détermination qualitative des anticorps IgM contre l'antigène viral de capsid (VCA) en sérum humain ou plasma (citrate).

3. PRINCIPE DE L'ANALYSE

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps IgM contre Epstein-Barr virus est basée sur la technique d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Des puits dans les bandes du plaque microtitre sont recouverts d'antigènes d'Epstein-Barr virus pour attacher les anticorps correspondants du spécimen. Après le lavage des puits ayant pour but d'enlever l'échantillon détaché, l'anti-humain IgM conjugué à HRP (horseradish peroxidase) est ajouté. Ce conjugué s'attache aux anticorps spécifiques pour le Epstein-Barr virus. Le complexe immun constitué par le conjugué attaché est visualisé en ajoutant le substrat de Tetramethylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgM spécifiques pour le Epstein-Barr virus dans le spécimen. De l'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. L'absorbance à 450 nm est lue en utilisant un lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA.

4. MATÉRIAUX

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'Epstein-Barr virus (IgM) :** 12 bandes cassables contenant 8 puits recouvertes d'antigène viral de capsid (VCA) d'Epstein-Barr virus; en sachets d'aluminium refermables.
- **Diluant de l'échantillon IgM *** :** 1 bouteille contenant 100 ml d'amortisseur pour la dilution de l'échantillon ; pH 7.2 ± 0.2 ; coloré verte ; prêt à utiliser ; couvercle blanc.
- **Solution D'Arrêt :** 1 bouteille contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.2 mol/l ; prêt à utiliser ; couvercle rouge.
- **Solution de lavage (20x concentré.) * :** 1 bouteille contenant 50 ml d'un amortisseur 20-fois concentré (pH 7.2 ± 0.2) pour laver les puits ; couvercle blanc.

- **Conjugué anti-IgM Epstein-Barr virus**** : 1 bouteille contenant 20 ml d'anticorps de lapin conjugués à peroxydase contre l'IgM humain ; coloré rouge, prêt à utiliser ; couvercle noir.
- **Solution de substrat de TMB** : 1 bouteille contenant 15 ml 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB) ; prêt à utiliser ; couvercle jaune.
- **Contrôle positif d'IgM Epstein-Barr virus***** : 1 bouteille contenant 2 ml ; coloré jaune ; prêt à utiliser ; couvercle rouge.
- **Contrôle cut-off d'IgM Epstein-Barr virus***** : 1 bouteille contenant 3 ml, coloré jaune; prêt à utiliser; couvercle vert.
- **Contrôle négatif d'IgM Epstein-Barr virus*****: 1 bouteille contenant 2 ml ; coloré jaune ; prêt à utiliser ; couvercle bleu.

* contient 0.1 % de Bronidox L après dilution
 ** contient 0.2 % de Bronidox L
 *** contient 0.1 % de Kathon

4.2. Matériaux fournis

- 1 support de bande
- 1 couverture autocollante
- 1 protocole d'essai
- 1 plan de distribution et d'identification

4.3. Matériaux et équipement requis

- lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA, équipé pour le mesurage de l'absorbance à 450/620nm
- Incubateur 37°C
- Équipement manuel ou automatique pour rincer les puits
- Pipettes pour usage entre le 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau désionisée ou (fraîchement) distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITÉ ET STOCKAGE

Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'échéance indiquée sur l'étiquette une fois stockés à 2... 8°C.

6. PRÉPARATION DE RÉACTIF

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient à la température de la pièce (20... 25°C) avant de commencer l'analyse!

6.1. Bandes recouvertes cassables

Les bandes cassables sont recouvertes d'antigène d' Epstein-Barr virus et sont prêt à utiliser. Conserver à 2... 8°C. *Après avoir détaché des bandes, les bandes restantes devraient tout de suite être refermées dans le sachet d'aluminium avec le desiccant fourni et être conservées à 2... 8°C; stable jusqu'à la date d'échéance. Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.2. Conjugué anti-IgM Epstein-Barr virus

La bouteille contient 20ml d'une solution avec de la peroxydase de raifort anti-humaine-IgM, l'amortisseur, les stabilisateurs, les préservatifs et un colorant rouge inerte. La solution est prêt à utiliser. Conserver à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.3. Contrôles

Les bouteilles marquées avec contrôle positif, contrôle cut-off et contrôle négatif contiennent une solution de contrôle prêt à utiliser. Elle contient 0.1% Kathon et doit être stockée à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2...8°C.*

6.4. Diluant de l'échantillon IgM

Le bouteille contient 100ml d'un amortisseur de phosphate, d'IgG anti-humain, des stabilisateurs, des préservatifs et un colorant vert inerte. Elle est employée pour la dilution de l'échantillon du patient. La solution contient des anticorps IgG anti-humains pour éliminer l'inhibition compétitive des anticorps IgG spécifiques pour ainsi enlever le facteur rhumatoïde. Cette solution prête à utiliser doit être stocké à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.5. Solution de lavage (20x conc.)

Le flacon contient 50 ml d'un tampon concentré, des détergents, des stabilisants et des conservateurs. Diluer la solution de lavage au 1/20^{ème} ; par exemple 10 ml de la solution de lavage + 190 ml d'eau bidistillée récente et non contaminée. *Le tampon dilué est stable pendant cinq jours si conservé à +2...+8°C. Le tampon concentré reste stable jusqu'à la date de péremption s'il est conservé à +2...+8°C. Les cristaux dans la solution disparaissent en chauffant à 37°C dans un bain marie.*

6.6. Solution de substrat de TMB

La bouteille contient 15ml d'un système de peroxyde de tetramethylbenzidine/hydrogen. Le réactif est prêt à utiliser et doit être stocké à 2... 8°C, loin de la lumière. *La solution devrait être sans couleur ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat se transforme en bleu, il a pu être contaminé et devrait être remplacé. Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.7. Solution d'arrêt

La bouteille contient 15ml d'une solution acide sulfurique de 0.2 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prêt à utiliser et doit être stocké à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

7. COLLECTION ET PRÉPARATION DES SPÉCIMENS

Utilisez des échantillons de sérum ou plasma (citrate) humain pour cette analyse. Si l'analyse est exécutée dans un délai de 5 jours après la collection de l'échantillon, le spécimen devrait être maintenu à 2... 8°C ; autrement ils devraient être aliquotés et conservés surgelés (-20 à -70°C). Si les échantillons sont conservés congelés, mélangez les échantillons décongelés bien avant l'analyse. *Évitez congélation et décongélation répétée.*

L' inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7.1. Dilution de l'échantillon

Avant l'analyse, tous les échantillons devraient être dilués 1+100 avec le diluant de l'échantillon IgM.

Diluer 10µl de l'échantillon avec 1ml du diluant de l'échantillon IgM dans des tubes pour obtenir une dilution 1+100 et mélanger celle-ci soigneusement par un Vortex.

8. PROCÉDÉ D'ANALYSE

8.1. Préparation d'analyse

Veillez lire le protocole de l'analyse soigneusement **avant d'exécuter** l'analyse. La fiabilité des résultats dépend de l'adhérence stricte au protocole de l'analyse comme décrit. La technique de dosage suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le dosage doit être effectué sur un automate, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume de la solution de lavage de 300 à 350 µl. Avant de commencer l'analyse, le plan de distribution et d'identification pour tous les spécimens et contrôles devrait être soigneusement établi sur la feuille de résultat fournie dans le kit. Choisissez le nombre requis de bandes ou de puits microtitres et insérez-les dans le support.

Veillez assigner au moins :

1 puits	(par exemple A1)	pour le blanc substrat,
1 puits	(par exemple B1)	pour le contrôle négatif
2 puits	(par exemple C1+D1)	pour le contrôle cut-off et
1 puits	(par exemple E1)	pour le contrôle positif.

C'est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient deux fois, si nécessaire.

Exécutez toutes les étapes de l'analyse dans l'ordre donné et sans délai entre les étapes.

Une pointe de pipette propre et jetable devrait être employée pour aliquoter chaque contrôle et échantillon.

Ajuster l'incubateur à 37° ± 1°C.

1. Pipettez 100µl de contrôles et les échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Gardez le puits A1 pour le substrat blanc.
2. Couvrez les puits de couvertures autocollantes.
3. **Incuber pour 1 heure ± 5 minutes à 37±1°C.**
4. Quand l'incubation a été accomplie, enlevez la couverture, aspirez le contenu des puits et lavez chaque puits trois fois avec 300µl de solution de lavage. Évitez les débordements des puits de réaction. Le temps de trempage entre chaque cycle de lavage devrait être > 5sec. À la fin, enlevez soigneusement le fluide restant en tapant les bandes sur des papiers en tissu avant la prochaine étape !

Note : Le lavage est décisif ! Un lavage insuffisant peut mener à une précision faible et à des valeurs d'absorbance faussement élevées.

5. Pipettez 100µl du conjugué anti-IgM Epstein-Barr virus dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermez avec la couverture autocollante.
6. **Incuber pendant 30 minutes à la température de la pièce.** *Ne pas exposer à la lumière du soleil directe.*
7. Répétez l'étape numéro 4.
8. Pipetter 100µl de la solution de substrat de TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à la température de la pièce dans l'obscurité.**
10. Pipetter 100µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat de TMB.

N'importe quelle couleur bleue développée pendant l'incubation se transforme en jaune.

Note : Des échantillons de patients fortement positifs peuvent causer des précipités foncés du chromogène ! Ces précipités peuvent influencer les valeurs mesurées de la densité optique. Il est recommandé de diluer l'échantillon avec la solution physiologique de chlorure de sodium, par exemple 1+1. Ensuite diluer l'échantillon 1+100 avec l'amortisseur et multiplier les résultats en NTU (NovaTec units) par 2.

11. Mesurer l'absorption du spécimen à 450/620nm dans un délai de 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

8.2. Mesurage

Ajuster le lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA à zéro en utilisant le substrat blanc dans le puits A1.

Si - pour raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le substrat blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorption du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorption mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorption de tous les puits à 450 nm et enregistrer les valeurs d'absorption pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Une lecture bichromatique de longueur d'onde employant 620 nm comme longueur d'onde de référence est recommandée.

En cas de plusieurs mesurages, calculer les valeurs moyennes d'absorption de tous les résultats.

9. RÉSULTATS

9.1. Critères De Validité

Afin qu'une analyse soit considérée valide, les critères suivants doivent être respectés :

- **Blanc Substrat** dans A1 : Valeur d'absorbance < **0,100**.
- **Contrôle négatif** dans B1 : Valeur d'absorbance < **0,200 et < cut-off**
- **Contrôle seuil (cut-off)** dans C1 et D1: Valeur d'absorbance **0,150 – 1,30**
- **Contrôle positif** dans E1 : Valeur d'absorbance > **contrôle seuil (cut-off)**.

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

9.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du contrôle seuil (cut-off).

Exemple : $0,37 \text{ DO cont. seuil} + 0,39 \text{ DO cont. seuil} = 0,76 \div 2 = 0,38$

« Cut-off » = 0,38

9.3. Interprétation des résultats

Des échantillons sont considérés **POSITIFS** si la valeur d'absorption est plus élevée que 10% au-dessus du « cut-off ».

Des échantillons avec une valeur d'absorption de 10% au-dessus ou au-dessous du « cut-off » ne devraient pas être considérés comme clairement positifs ou négatifs

→ **zone grise**

Il est recommandé de répéter l'analyse après 2 - 4 semaines avec un échantillon frais. Si les résultats de la deuxième analyse sont encore dans la zone grise l'échantillon doit être considéré **NÉGATIF**.

Des échantillons sont considérés **NÉGATIFS** si la valeur d'absorption est inférieure à 10% au-dessous du « cut-off ».

9.3.1. Résultats en unités NovaTec

Valeur (moyenne) d'absorption du patient x 10 = [unités NovaTec = NovaTec units= NTU]

« cut-off »

Exemple : $\frac{1,786 \times 10}{0,38} = 47 \text{ NTU}$

« Cut-off » :	10	NTU
Zone grise :	9-11	NTU
Négatif :	< 9	NTU
Positif :	> 11	NTU

10. CARACTÉRISTIQUES D'EXÉCUTION

10.1. Précision

<u>Intera-analyse</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>cv (%)</u>
Sérum pos.	24	1.37	6.9
<u>Intra-analyse</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>cv (%)</u>
Sérum pos.	25	1.32	5.1

10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir d'un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est 96.3%.

10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir d'un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est 93.9%.

10.4. Interférence

Aucune interférence n' a été observée sur des sérums hémolytiques, lipémiques ou ictériques pour des concentrations allant jusqu' à 10 mg/ml d' hémoglobine, 5 mg/ml de triglycérides et 0.2 mg/ml de bilirubine.

10.5. Réaction croisée

Panel Prof. Krech/Frauenfeld/Swiss

Infection Aigue	NovaTec EBV IgM ELISA
Adenovirus	neg.
CMV	neg.
Echinococcus	neg.
HBV	neg.
Influenza A	neg.
Influenza B	neg.
Leptospira	neg.
Picorna	neg.
Fièvre Q	neg.
Rubella	neg.
Toxoplasma	neg.
VZV	neg.
Lues	neg.
RSV	neg.

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés ; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

11. LIMITATIONS DU PROCÉDÉ

Une contamination bactérienne ou des cycles gel-dégel répétés du spécimen peuvent affecter les valeurs d'absorption. Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques.

Les données sérologiques sont de valeur limité dans le cas des patients immunocompromis et des nouveaux-nés.

12. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le NovaLisa ELISA est uniquement destiné à l'utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

AVERTISSEMENT : Dans la concentration utilisée, Bronidox L ne pose pratiquement aucun risque toxicologique lors du contact avec la peau et les membranes muqueuses !

AVERTISSEMENT : L'acide sulfurique irrite les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. Lors du contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !

12.1. Mesures d'élimination

Les résidus de réactifs et des préparations sont considérés comme de déchets potentiellement dangereux. L'élimination de ces déchets est soumise à des réglementations nationales et locales. Contacter les autorités locales ou les sociétés spécialisées pour obtenir des conseils sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION DE COMMANDES

Numéro de Produit : EBVM 0150 Epstein-Barr virus (VCA) IgM-ELISA (96 déterminations)

1. INTRODUZIONE

Il Virus d'Epstein-Barr é l'agente eziologico della monocucleosi e causa varie malattie maligne ad esempio il linfoma e il carcinoma nasofaringeale. Appartiene al gruppo degli herpes virus, è con involucro e contiene DNA lineare a doppio filamento che contiene i geni per varie proteine. Dopo la replicazione iniziale nelle cellule della faringe il virus infetta i linfociti B e s'inserisce nelle ghiandole salivari. La maggior parte di queste cellule infettate vengono eliminate dai linfociti T. Il virus può rimanere in modo latente nelle cellule non riconosciute dal sistema immunitario ed in condizioni di una difesa immunitaria ridotta può ricominciare a riprodursi. Come tutti i virus della famiglia herpes sono ubiquitari e causano un'infezione persistente. La trasmissione avviene attraverso la saliva e quindi con i baci, per questo viene anche chiamato "kissing disease". Nei paesi industrializzati la contaminazione della popolazione è del 40% delle persone superiori ai 15 anni ed il 80-90% in età adulta. In paesi poco industrializzati la percentuale degli infettati è quasi il 100% già ad una età di 3 anni. La maggior parte delle infezioni sono asintomatiche.

Specie	Malattia	Sintomi	Modo d'infezione
Virus d'Epstein-Barr	Mononucleosi	Faringite, cefalea, febbre, enantema, gonfiore dei linfonodi, tonsillite Complicanze: Meningite, encefalite, epatosplenomegalia	Trasmissione: orale (saliva)

Diagnosi

- PCR
- Sierologia: "mono-spot" test; ELISA

2. USO PREVISTO

Il NovaTec Virus d'Epstein-Barr IgM ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgM per Virus d'Epstein-Barr nel siero o plasma (citrato) umano.

3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgM per Virus d'Epstein-Barr si basa sul principio ELISA. I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con antigeni specifici del Virus d'Epstein-Barr. Anticorpi specifici nel campione si legano agli antigeni immobilizzati nei pozzetti. Gli anticorpi del coniugato (perossidasi di rafano-anticorpi anti-IgM umani) si legano ai complessi antigene (fase solida)-anticorpo (paziente) nei campioni positivi. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per il Virus d'Epstein-Barr di classe IgM presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Micropiastre con antigeni del Virus d'Epstein-Barr (IgM):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni del Virus d'Epstein-Barr; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgM***:** 1 fialone contenente 100 ml di tampone per diluire i campioni; pH 7.2 ± 0.2; color verde; pronto all'uso; tappo bianco; contiene anticorpi anti IgG umani.
- **Soluzione stop:** 1 fialone contenente 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):** 1 fialone contenente 50 ml di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH 7.2 ± 0.2; tappo bianco.
- **Coniugato Virus d'Epstein-Barr anti IgM**:** 1 fialone contenente 20 ml di anticorpi di coniglio anti-IgM umani, coniugati a perossidasi; color rosso; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione TMB:** 1 fialone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- **Virus d'Epstein-Barr IgM Controllo positivo***:** 1 fialone da 2 ml; color giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- **Virus d'Epstein-Barr IgM Controllo Cut-off***:** 1 fialone da 3 ml; color giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- **Virus d'Epstein-Barr IgM Controllo negativo***:** 1 fialone da 2 ml; color giallo; tappo blu; pronto all'uso.

* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione

** contiene 0.2 % Bronidox L

*** contiene 0.1 % Kathon

4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso!

6.1. Micropiastre

I pozzetti sono separabili. Contengono adesivi antigeni inattivati del Virus d'Epstein-Barr. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2-8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.2. Coniugato Virus d'Epstein-Barr IgM

Il flacone contiene 20 ml di anticorpi anti-IgM umani coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti e un colorante inerte rosso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.3. Controlli

I flaconi dei controlli contengono di soluzione pronta all'uso. Contengono 0,1% Kathon. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.4. Tampone diluente IgM

Il flacone contiene 100 ml di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante verde inerte. La soluzione contiene anticorpi anti IgG umani per togliere dai campioni gli anticorpi specifici della classe IgG ed i fattori reumatici legati ad anticorpi IgG. Viene usata per diluire i campioni. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.

6.5. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino a 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37°C prima di diluire. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.6. Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.7. Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 ml di acido solforico, 0,2 mol/l (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Usare campioni di siero o plasma (citrate) umano. Se il test viene fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2-8°C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra -70...-20°C. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.*

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1 + 100 con tampone diluente IgM. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone e mescolare bene (Vortex).

8. PROCEDIMENTO

8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350 µl per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre

Utilizzare almeno:

1 pozzetto	(es. A1)	per il bianco-substrato (blank)
1 pozzetti	(es. B1)	per il controllo negativo
2 pozzetti	(es. C1+D1)	per il controllo Cut-off
1 pozzetto	(es. E1)	per il controllo positivo.

È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

Regolare l'incubatore a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$

1. Pipettare 100 µl di controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora \pm 5 min a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.

Attenzione: Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.

5. Pipettare 100 µl di Coniugato Virus d'Epstein-Barr anti-IgM in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente ($20^{\circ}\dots 25^{\circ}\text{C}$).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente ($20^{\circ}\dots 25^{\circ}\text{C}$) al buio.**
10. Pipettare 100 µl di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*

Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni con soluzione fisiologica NaCl, esempio 1+1. Poi diluire normalmente 1 + 100 con tampone diluente IgM. Il risultato NTU viene moltiplicato per due.

11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) a **zero** usando il substrato-bianco (blank) **in A1**. Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

9. RISULTATI

9.1. Validazione del test

Il test è valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato bianco** in A1: Valore di assorbanza < **0.100**
- **Controllo negativo** in B1: Valore di assorbanza < **0.200 e < cut-off**
- **Controllo Cut-off** in C1 e D1: Valore di assorbanza **0.150 – 1.30**
- **Controllo positivo** in E1: Valore di assorbanza > **Cut-Off**

Se non vengono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-Off e' la media dei valori di assorbanza dei controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.39 + valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.37 = 0.76/2 = 0.38
Cut-Off = 0.38

9.3. Interpretazione dei risultati

I campioni sono **positivi**, se l'assorbanza supera il Cut-Off almeno del 10 %.

Campioni con assorbanze del 10 % al di sopra o al di sotto del Cut-Off non sono identificabili come positivi o negativi → **Dubbio**
In questo caso è raccomandato di ripetere il test dopo 2 o 4 settimane con un campione fresco. Se il risultato è ancora incerto viene considerato **negativo**.

I campioni sono **negativi**, se l'assorbanza risulta inferiore del Cut-Off almeno del 10 %.

9.3.1. Risultati in unità NovaTec [NTU]

$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{unità NovaTec} = \text{NTU}]$

Esempio: $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off :	10	NTU
Dubbio:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

10. CARATTERISTICHE DEL TEST

10.1. Precisione

Interdosaggio	n	Media	Cv (%)
Siero pos.	24	1.37	6.9

Intradosaggio	n	Media	CV (%)
Siero pos.	25	1.32	5.1

10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica è pari a 91%.

10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica è pari a 97.2%.

10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed iterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,2 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni di interferenza nel presente test.

10.5. Reattività incrociata

Panel Prof. Krech/Frauenfeld/Swiss

Infezione acuta	NovaTec EBV IgM ELISA
Adenovirus	neg.
CMV	neg.
Echinococcus	neg.
Virus dell'epatite B	neg.
Influenza A	neg.
Influenza B	neg.
Leptospira	neg.
Picorna	neg.
Q-Fever	neg.
Rubeola	neg.
Toxoplasma	neg.
Varicella Zoster	neg.
Lues	neg.
Virus respiratorio sinciziale	neg.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.

11. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze. La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato. Il risultato negativo non esclude la possibilità di essere infetto dal virus. Specialmente all'inizio dell'infezione è possibile che la presenza di anticorpi nel siero sia insufficiente per una determinazione esatta. Se vi è il sospetto clinico si raccomanda di ripetere il test dopo 2-3 settimane con un campione nuovo.

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- Il NovaLisa™ ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

ATTENZIONE: Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.

ATTENZIONE: L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Numero del prodotto: EBVM0150 Virus d'Epstein-Barr IgM-ELISA (96 determinazioni)

1. INTRODUCCIÓN

El virus Epstein-Barr (VEB) se desarrolla clínicamente como mononucleosis y es de importancia en la patogenésis de enfermedades malignas como los linfomas (Burkitt), el carcinoma de la nasofaringe y otros síndromes linfoproliferativos. El VEB pertenece a la familia de los virus gamma-herpes y tiene una envoltura de lipoproteínas. Las células infectadas tienen el receptor de complemento 2 (CR-2=CD21) y son células epiteliales o los linfocitos. El genoma del VEB está constituido por una molécula de A.D.N. bicatenario que codifica aproximadamente unas 100 proteínas.

El VEB infecta inicialmente las células epiteliales de la orofaringe y posteriormente pasa a los linfocitos B en la glándula salivar. Por inmortalización estas células B se expanden clonalmente. La mayoría de estas células son eliminadas por linfocitos T citotóxicos. En las pocas células supervivientes permanece una infección latente. Estas células no son reconocidas por el sistema inmunológico y pueden producir partículas virales después de una estimulación inmunitaria.

Como todos los herpes virus, el VEB es un patógeno ubicuo persistente. Es segregado y transmitido por la saliva lo que le ha dado en combinación con la primoinfección mononucleósisis el sobrenombre "kissing disease". En las naciones industrializadas la prevalencia hasta los 15 años es de aprox. 40 %, para aumentar hasta el 80 a 90 % en los adultos. En los países de bajo nivel higiénico la prevalencia es cerca del 100 % ya en los niños de tres años. Se han descrito infecciones iatrogénicas por transplantes. La mayor parte de las infecciones se desarrollan asintomáticas.

Especies	Enfermedad	Vía de transmisión	Síntomas	Complicaciones
virus Epstein-Barr	mononucleosis infecciosa	gotitas de fluido contaminado, saliva	faringitis, dolores de cabeza, fiebre, exantema, linfadenitis, amigdalitis con placas blancas, a veces hepatosplenomegalia	meningitis, encefalitis

El virus puede ser detectado por:

- PCR
- Serología: "mono spot" test, detección de anticuerpos a través de ELISA

El diagnóstico serológico se aprovecha de la inducción de diferentes inmunoglobulinas contra antígenos del VEB: El antígeno de la cápside (ACV) IgG y IgM, el antígeno EA-IgM (EA=early antigen) y el antígeno nuclear (EBNA= Epstein-Barr Virus nuclear antigen). En infecciones agudas el antígeno de la cápside viral (ACV) IgM y IgG. Una reactivación se detecta por un aumento de los valores ACV-IgG. Cuando faltan antígenos contra la cápside viral el paciente es susceptible de una infección con VEB.

2. USO PREVISTO

El ensayo de inmunoenzima de Nova Tec es para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra los Virus Epstein-Barr en suero o plasma (citrato) humano.

3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos contra los Virus Epstein-Barr se basa en la técnica del ELISA (Enzym linked Immunosorbent Assay). Las tiras de micropocillos que se usan como fase sólida están recubiertas con antígenos específicos del Virus Epstein-Barr. Los anticuerpos existentes en la muestra unen a los antígenos inmovilizados de la placa de microtitulación. El conjugado de anticuerpos IgM anti humano con peroxidasa de rábano, se une con los complejos antígeno-anticuerpo en muestras positivas. Estos complejos inmunológicos desarrollan una coloración azul después de incubarlos con sustrato de tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, causando un cambio de coloración de azul a amarillo. La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 450nm.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Microtiras (IgM) recubiertas de antígeno del virus Epstein-Barr:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos inactivados de la cápside (p 18) del virus Epstein-Barr, en bolsa de aluminio.
- **Diluyente para IgM de la muestra***:** 1 botella de 100ml de solución de tampón para diluir la muestra; pH 7.2 ± 0.2; color verde; listo para ser utilizado; tapa blanca.
- **Solución de parada:** 1 botella de 15ml de ácido sulfúrico, 0.2mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Solución de lavado (20x conc.)*:** 1 botella de 50ml de una solución de tampón 20x concentrado para lavar los pocillos; pH 7.2 ± 0.2; tapa blanca.
- **Conjugado IgM anti-humano (virus Epstein-Barr)**:** 1 botella de 20ml de conjugado de anticuerpos IgM anti-humano con peroxidasa; color rojo; tapa negra.
- **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control positivo de IgM (virus Epstein-Barr)***:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado.
- **Control cut-off de IgM (virus Epstein-Barr)***:** 1 botella de 3ml; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado

- **Control negativo de IgM (virus Epstein-Barr)***:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado.

* contiene 0.1% de Bronidox L después de diluir

** contiene 0.2% Bronidox L

*** contiene 0.1% Catón

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 soporte
- 1 hoja de instrucciones
- 1 hoja de resultados

4.3. Materiales y instrumentos necesarios

- Fotómetro con filtros de 450/620 nm
- Incubadora/cámara húmeda con termostato
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas con jeringuillas desechables (10, 100, 200, 1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Tubos de plástico desechables
- Gradilla para los tubos
- Agua destilada
- Cronómetro

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

El test tiene que estar almacenado de 2...8°C. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de las botellas y en el exterior.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos, las muestras y los controles tienen que estar a la temperatura ambiente (20...25°C) antes de ser utilizados!

6.1. Tiras reactivas

Las tiras separables recubiertas con antígeno del virus Epstein-Barr están selladas. Los pocillos listos para ser utilizados tienen que estar almacenados de 2...8°C. *Mantener los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio junto con el desecante y conservar de 2...8°C. El producto se conserva hasta la fecha de caducidad indicada.*

6.2. Conjugado de IgM anti-humano (virus Epstein-Barr)

La botella contiene 20ml de una solución de IgM anti-humano conjugada con peroxidasa de rábano, tampón, estabilizadores, conservante y un colorante rojo inerte. La solución está lista para ser utilizada y tiene que estar almacenada de 2...8°C. *Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado de 2...8°C.*

6.3. Controles

Las botellas de los controles contienen de solución de control listas para ser utilizadas. Las soluciones tienen que estar almacenadas de 2...8°C y contienen 0.1% de Catón. *Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado de 2...8°C.*

6.4. Tampón de dilución de IgM para la muestra

La botella contiene 100ml de tampón de fosfato, estabilizadores, conservantes y un colorante amarillo inerte. La solución lista para ser utilizada ha de almacenarse entre 2...8°C. La solución se usa para diluir las muestras. *Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado de 2...8°C.*

6.5. Solución para lavar (20x conc.)

La botella contiene 50ml de tampón concentrado, detergentes y conservantes. El contenido se diluye con un litro de agua destilada (1+19). La solución diluida es estable 5 días a temperatura ambiente. *La cristalización en el concentrado desaparece al calentarla a 37°C y mezclarla bien antes de usarla. Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado de 2...8°C.*

6.6. Solución de TMB

La botella contiene 15ml de una mezcla de tetrametilbenzidina con peróxido de hidrógeno. La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C protegida de la luz. *La solución es levemente azulada. En caso de contaminación cambia a una coloración azul más intensa no pudiendo ser utilizada en el ensayo.*

6.7. Solución de parada

La botella contiene 15ml de 0.2 M de ácido sulfúrico (R36/38, S26). La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C. Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8°C, en caso contrario hay que congelarlas (-20°C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1+100 con el tampón de dilución para la muestra de IgM, p.e. 10µl de la muestra con 1ml de tampón, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido para el método manual. Para excluir efectos de lavado en caso de utilizar los automáticos ELISA elevas el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de solución de lavado de 300 µl a 350 µl. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los controles en la hoja de resultados suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos en el soporte.

En este caso por lo menos

1 pocillo	(z.B. A1)	para el blanco,
1 pocillo	(z.B. B1)	para el control negativo,
2 pocillos	(z.B. C1+D1)	para el control cut-off y
1 pocillo	(z.B. E1)	para el control positivo

Para mayor seguridad es necesario hacer doble ensayo de controles y muestras del paciente.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a 37 ± 1°C

1. Pipetear 100 µl de controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. Incubar **1 h ± 5 min a 37°C**.
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300µl de la solución de lavado. Evita el rebosamiento de los pocillos. El tiempo entre cada lavado y cada aspiración tiene que ser por lo menos de 5 segundos. Para sacar el resto del líquido de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.

Ojo: El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y resultados erróneamente aumentados!

5. Pipetar 100µl de conjugado anti-IgM (virus Epstein-Barr) en cada pocillo con excepción del blanco. Cubrir con una lámina adhesiva.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25°C). Evitar la luz solar directa.**
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetar 100µl de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 C).**
10. Pipetear en todos los pocillos 100µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el sustrato de TMB. *Toda coloración azul formada durante la incubación se convierte en amarilla.*

Nota: *Muestras que son altamente positivas pueden causar precipitados negros del cromógeno! Estos precipitados influyen en los valores de las mediciones. Se recomienda diluir las muestras del paciente con solución salina 1+1. Después, preparar la muestra diluida con el tampón de dilución para la prueba de IgM 1+100. En este caso, el resultado se multiplica por 2.*

11. Medir la extinción de la solución en cada pocillo con 450/620nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

8.2. Medición

Efectuar con ayuda del blanco en el pocillo **A1** la **calibración al cero** del fotómetro (lector de ELISA).

Para obtener resultados correctos, si la calibración no es posible por causas técnicas, hay que sustraer el valor de la extinción de la posición A1 del resto de los valores de extinción!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450nm** y anotar los resultados de los controles y de las muestras en la hoja de resultados.

*Es aconsejable la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620nm.*

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular el **promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco** en A1 extinción < **0.100**
- **Control negativo** en B1 extinción < **0.200 y < cut-off**
- **Control cut-off** en C1 y D1 extinción **0,150 – 1,30**
- **Control positivo** en E1 extinción **>cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

9.2. Calculo del valor de la medición

El *cut-off* se obtiene de los valores de la extinción de los dos controles Cut-off.

Ejemplo: 0,42 OD Cut-off Control + 0,44 OD Cut-off Control = 0,86:2 = 0,43

$$\text{Cut-off} = \underline{0,43}$$

9.3. Interpretación de los resultados

Las muestras se consideran positivas cuando el valor de la extinción es como mínimo mayor al 10% del valor del *cut-off*.

Las muestras con valores de extinción $\pm 10\%$ del *cut-off* no pueden ser consideradas claramente positivas o negativas → **Zona intermedia**

Se recomienda entonces repetir el ensayo con nuevas muestras del paciente de 2 a 4 semanas más tarde. Si de nuevo se encuentran resultados en la zona intermedia, la muestra tiene que estar valorada como **negativa**.

Las muestras se consideran **negativas** si el valor de la extinción esta por lo menos un 10% por debajo del *cut-off*.

9.3.1. Resultados en unidades Nova Tec [NTU]

Promedio de la extinción de la muestra x 10 = [NovaTec-unidades = NTU]
Cut-Off

Ejemplo: $\frac{1,204 \times 10}{0,43} = 28 \text{ NTU (NovaTec unidades)}$

Cut-Off :	10	NTU
Zona intermedia:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1. Precisión

Inter ensayo	n	Promedio	CV (%)
Serum pos.	24	1.37	6.9

Intra ensayo	n	Promedio	CV (%)
Serum pos.	25	1.32	5.1

10.2. Especificidad del ensayo

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia de la sustancia a analizar específicamente. Es de 96.3 %.

10.3. Sensibilidad del ensayo

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es de 93.9 %.

10.4. Interferencias

Las muestras lipémicas e ictericas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/ml para triglicéridos y de 0,2 mg/ml para bilirrubina.

10.5. Reactividad cruzada

Panel Prof. Krech/Frauenfeld/Swiss

infección acuidad NovaTec EBV IgM ELISA

Adenovirus	neg.
CMV	neg.
Equinococcus	neg.
HBV	neg.
Influenza A	neg.
Influenza B	neg.
Leptospira	neg.
Picornia	neg.
Q-Fever	neg.
Rubella	neg.
Toxoplasma	neg.
VZV	neg.
Lues	neg.
RSV	neg.

Los resultados están basados en pruebas de ensayos querales: No se trata de especificaciones garantizadas.

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en personas inmunodeprimidas o en neonatos.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnostico in vitro.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron **no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG**. No obstante, todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Pipetear cuidadosamente las muestras y el conjugado en los pocillos para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados.
- El NovaLisa™ ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

ADVERTENCIA: Bronidox L, en la concentración utilizada, casi no muestra riesgos tóxicos en la piel y en las mucosas.

ADVERTENCIA: El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel! En caso de contacto con los ojos lavar abundantemente con agua y consultar a un médico.

12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos






Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

N° del producto: EBVM0150 Virus Epstein-Barr IgM-ELISA (96 determinaciones)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

- Bergman M., Gleckman R.A., "Heterophil-negative infectious mononucleosis-like syndrome". *Postgrad.Med.*, 81 (1): 313-326 (1987)
- Buchwald D., Komaroff A.L., "Review of laboratory findings for patient with chronic fatigue syndrome". *Rev. Inf. Dis.*, 13 (Suppl. 1): S12-S18 (1991)
- De Ory F., Antonaya J., Fernandez M.V., Echevarria J.M., "Application of low-avidity immunoglobulin G studies to diagnosis of EBV infectious mononucleosis". *J. Clin. Microbiol.*, 31 (6): 1669-1671, (1993)
- De-The, G., "Epidemiology of EBV and Associated Diseases in Man", In: *The Herpesviruses*, Roizman, B. (ed.), Volume 1, New York: Plenum-Press, 25-103, (1982)
- Dölken G., Weitzmann U., Boldt C. et al., "Enzyme linked immunosorbent assay for IgG antibodies of EBV virus associated early antigens and viral capsid antigen". *J. Immunol. Methz.*, 67: 225-233, (1984)
- Färber I., Wutzler P., Wohlrahe P. et al., "Serological diagnosis of infectious mononucleosis using three anti-Epstein-Barr virus recombinant ELISAs", *J. Virol. Methz.*; 42: 301-308, (1993)
- Gorgiewski-Hrisoho M., Hinderer W., Nebel-Schickel H. et al., "Serodiagnosis of infectious mononucleosis by using recombinant Epstein-Barr virus antigens and enzyme-linked immunosorbent assay technology", *J. Clin. Microbiol.*, 28 (10): 2305-2311, (1990)
- Halprin J., Scott A.L., Jacobson L. et al., "Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to Epstein-Barr virus nuclear and early antigens in patients with infectious mononucleosis and nasopharyngeal carcinoma", *Ann. Int. Med.*, 104: 331-337, (1986).
- Heath, C.W., A.L. Brodsky, and A.L. Ptolosky, "Infectious Mononucleosis in a general population", *Am. J. Epidemiology*, 95 (1): 46-52, (1972)
- Henle W., Henle GE., Horwitz CA., "Epstein-Barr virus specific giagnostic tests in infectious mononucleosis", *Human Pathol.*, 5 (5): 551-565, (1974)
- Lamy ME., Favart AM., Cornu A. et al., "Study of Epstein-Barr virus (EBV) antibodies: IgG and IgM anti-VCA, IgG anti EA and Ig anti-EBNA obtained with an original microtiter technique. Serological criteria of primary and recurrent EBV infections and follow-up of infectious mononucleosis. Seroepidemiology of EBV in Belgium based on 5178 sera from patients". *Acta Clin. Belg.*, 37 (5): 281-298, (1982)
- Lennette E., "Epstein-Barr Virus", in *Manual of Clinical Microbiology*, 4th ed. Washington D.C., Am. Soc. Microbiol. P 728-732, (1985)
- Luka J., Chase PC., Pearson GR., "A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against the major EBV-associated antigens. I-Correlation between ELISA and immunofluorescence titers using purified antigens", *J. Immunol. Metho.*, 67: 145-156, (1984)
- Pearson GP., "Infectious Mononucleosis: the humoral response", In: *Infectious mononucleosis*, D. Schlossberg ed., Springer-Verlag, New York, p. 89-99, (1989)
- Pochedy C., "Laboratory testing for infectious mononucleosis: cautions to observe in interpreting results". *Prostgrad. Med.*, 81 (1): 335-342 (1987)
- Purtilo BT., Hinrichs S., "Detection of Epstein-Barr Virus induced diseases by laboratory techniques", *Incstar Monograph*, (1993)

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
LOT	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento
CE	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ MarcaCE
[REF]	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso
MTP	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca
CONJ	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado
CONTROL -	Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ Sérum de contrôle négatif/ siero di controllo, negativo /Suero control negativo
CONTROL +	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérum de contrôle positif/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo
CUT OFF	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérum de contrôle du cut-off/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off
DIL M	Sample diluent buffer IgM/ IgM-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgM/ soluzione tampone per i campioni IgM/ solución tampón para muestras IgM
SOLN STOP	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante
SUB TMB	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solción substrato TMB
WASHBUF 20x	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Solution de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenido suficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests

SCHEME OF THE ASSAY

Epstein-Barr Virus IgM-ELISA

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative control	Positive control	Cut-off control	Sample (diluted 1+100)
Negative control	-	100µl	-	-	-
Positive control	-	-	100µl	-	-
Cut-off control	-	-	-	100µl	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300µl of washing solution					
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300µl of washing solution					
TMB Substrate	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark					
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629

Email : info@NovaTec-ID.com

Internet: www.NovaTec-ID.com

EBVM0150engl,dt,fr,it,es31082011CS