

Instructions for Use

EBV-VCA IgG ELISA

IVD



REF EIA-3475



96



DRG

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTRODUCTION	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST	2
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	3
4	KIT COMPONENTS	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5
6	ASSAY PROCEDURE	5
7	CALCULATION OF RESULTS	7
8	QUALITY CONTROL.....	7
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	8
10	LIMITATIONS OF USE.....	9
11	LEGAL ASPECTS	9
12	REFERENCES / LITERATUR	9

1	INTRODUCCIÓN	23
2	PRINCIPIO DE LA PRUEBA.....	23
3	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	23
4	REACTIVOS.....	24
5	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS ..	25
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	25
7	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS	27
8	CONTROL DE CALIDAD	27
9	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO.....	28
10	LIMITACIONES DE USO	28
11	ASPECTOS LEGALES	29
12	REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA	29

1	EINLEITUNG	10
2	TESTPRINZIP	10
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	10
4	BESTANDTEILE DES KITS	11
5	PROBENVORBEREITUNG.....	12
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	12
7	ERGEBNISSE	14
8	QUALITÄTSKONTROLLE	15
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA	15
10	GRENZEN DES TESTES.....	15
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	16
12	REFERENZEN / LITERATUR	16

SYMBOLS USED.....	30
-------------------	----

SHORT INSTRUCTIONS FOR USE.....	31
---------------------------------	----

1	INTRODUZIONE	17
2	PRINCIPIO DEL TEST	17
3	PRECAUZIONI	17
4	COMPONENTI DEL KIT.....	18
5	CAMPIONI.....	19
6	ATTUAZIONE DEL TEST.....	19
7	RESULTATI.....	21
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	21
9	CARATTERISTICHE DEL TEST	22
10	LIMITAZIONI	22
11	ASPETTI LEGALI	22
12	BIBLIOGRAFIA.....	22

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DRG EBV-VCA IgG ELISA** provides materials for the **qualitative** and **semiquantitative** determination of IgG-class antibodies to Epstein Barr Virus (VCA) in human serum and plasma.

This assay is intended for in vitro diagnostic use only.

1.2 Summary and Explanation

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.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The **DRG EBV-VCA IgG ELISA** is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Microtiter wells as a solid phase are coated with inactivated Epstein Barr Virus (VCA) antigen (rec. protein p18 + p23).

Diluted patient specimens and **ready-for-use controls** are pipetted into these wells. During incubation Epstein Barr Virus (VCA)-specific antibodies of positive specimens and controls are bound to the immobilized antigens.

After a washing step to remove unbound sample and control material horseradish peroxidase conjugated anti-human IgG antibodies are dispensed into the wells. During a second incubation this anti-IgG conjugate binds specifically to IgG antibodies resulting in the formation of enzyme-linked immune complexes.

After a second washing step to remove unbound conjugate the immune complexes formed (in case of positive results) are detected by incubation with TMB substrate and development of a blue color. The blue color turns into yellow by stopping the enzymatic indicator reaction with sulfuric acid.

The intensity of this color is directly proportional to the amount of Epstein Barr Virus (VCA)-specific IgG antibody in the patient specimen. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microtiter plate reader.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Avoid contact with Stop Solution containing 0.2 mol/L H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
- The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided
- Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
- Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
- Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
- Never pipette by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according the national biohazard safety guideline or regulation.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

4 KIT COMPONENTS

4.1 Contents of the Kit

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with inactivated Epstein Barr Virus (VCA) antigen (rec. protein p18+p23).
(incl. 1 strip holder and 1 cover foil)
 2. **Sample Diluent** *, 1 vial, 100 mL, ready to use,
colored yellow; pH 7.2 ± 0.2 .
 3. **Pos. Control** *, 1 vial, 1.0 mL, ready to use;
colored yellow, red cap.
 4. **Neg. Control** *, 1 vial, 2.0 mL, ready to use;
colored yellow, yellow cap.
 5. **Cut-off Control** *, 1 vial, 2.0 mL, ready to use;
colored yellow, black cap.
 6. **Enzyme Conjugate** *, 1 vial, 20 mL, ready to use,
colored red,
antibody to human IgG conjugated to horseradish peroxidase.
 7. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
Tetramethylbenzidine (TMB).
 8. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
contains 0.2 mol/L H_2SO_4 .
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
 9. **Wash Solution** *, 1 vial, 30 mL (20X concentrated for 600 mL), pH 6.5 ± 0.1
see „Preparation of Reagents“.
- * Contain non-mercury preservative.

4.1.1 Material required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450/620 nm ± 10 nm)
(e.g. the DRG Instruments Microtiter Plate Reader)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Timer
- Absorbent paper

4.2 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

4.3 Reagent Preparation

Allow all reagents and required number of strips to reach room temperature prior to use.

Wash Solution

Dilute **Wash Solution 1+19** (e.g. 10 mL + 190 mL) with fresh and germ free redistilled water. This diluted wash solution has a pH value of 7.2 ± 0.2 .

Consumption: ~ 5 mL per determination.

Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. Be sure that the crystals are completely dissolved before use.

The diluted Wash Solution is stable for 4 weeks at 2 °C to 8 °C.

4.4 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheets.

4.5 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DRG has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma can be used in this assay.

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.2 Specimen Storage

Specimens should be capped and may be stored for up to 5 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

Prior to assaying dilute each patient specimen **1+100** with *Sample Diluent*,

e.g. 10 µL of specimen + 1 mL of *Sample Diluent*, **mix well, let stand for 15 minutes, mix well.**

Please note: Controls are ready for use and must not be diluted!

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- **It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature before starting the test run!**
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- During 37 °C incubation cover microtiter strips with foil to avoid evaporation.

6.2 Test Procedure

Prior to commencing the assay, dilute *Wash Solution*, **prepare patient samples as described in point 5.3**, mix well before pipette and establish carefully the **distribution and identification plan** supplied in the kit for all specimens and controls.

1. 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 <i>Neg. Control</i> ,	
2 wells	(e.g. C1+D1)	for the <i>Cut-off Control</i>	and
1 well	(e.g. E1)	for the <i>Pos. Control</i> .	

It is left to the user to determine controls and patient samples in duplicate.

2. Dispense

100 µL of *Neg. Control* into well B1
100 µL of *Cut-off Control* into wells C1 and D1
100 µL of *Pos. Control* into well E1 and
100 µL of each diluted sample with new disposable tips into appropriate wells.
 Leave well A1 for substrate blank!

3. Cover wells with foil supplied in the kit. Incubate for **60 minutes at 37 °C**.
4. Briskly shake out the contents of the wells.
 Rinse the wells **5 times** with diluted *Wash Solution* (**300 µL per well**). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note:
 The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
5. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well, **except A1**.
6. Incubate for **30 minutes at room temperature (20 °C to 25 °C)**.
Do not expose to direct sun light!
7. Briskly shake out the contents of the wells.
 Rinse the wells **5 times** with diluted *Wash Solution* (300 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
8. Add **100 µL of Substrate Solution** into all wells.
9. Incubate for **exactly 15 minutes at room temperature (20 °C to 25 °C) in the dark**.
10. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of *Stop Solution* to each well.
 Any blue color developed during the incubation turns into yellow.
Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen!
11. Read the optical density at **450/620 nm** with a microtiter plate reader **within 30 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Measurement

Adjust the ELISA microplate or microstrip 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.

7 CALCULATION OF RESULTS

7.1 Validation of the Test Run

The test run may be considered valid provided the following criteria are met:

Substrate blank in A1:	Absorbance value lower than 0.100
Neg. Control in B1:	Absorbance value lower than 0.200
Cut-off Control in C1/D1 :	Absorbance value between 0.350 – 0.850
Pos. Control in E1:	Absorbance value between 0.650 – 3.000

7.2 Calculation

Mean absorbance value of Cut-off Control [CO]

Calculate the mean absorbance value of the two (2) Cut-off Control determinations (e.g. in C1/D1).

Example: $(0.44 + 0.46) / 2 = 0.45 = CO$

7.3 Interpretation

POSITIVE Patient (mean) absorbance values more than 10 % above CO
(Mean OD patient > 1.1 x CO)

GREY ZONE Patient (mean) absorbance values from 10 % above to 10 % below CO
repeat test 2 - 4 weeks later - with new patient samples
($0.9 \times CO \leq \text{Mean OD patient} \leq 1.1 \times CO$)

Results in the second test again in the grey zone \Rightarrow **NEGATIVE**

NEGATIVE Patient (mean) absorbance values more than 10 % below CO
(Mean OD patient < 0.9 x CO)

7.3.1 Results in DRG Units [DU]

$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{CO} = [\text{DRG Units} = \text{DU}]$

Example: $\frac{1.580 \times 10}{0.45} = 35 \text{ DU}$

Interpretation of Results

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

8 QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.21 - 60 DU/mL.

9.2 Specificity of Antigen (Cross Reactivity)

Due to the high seroprevalence of Epstein-Barr Virus (VCA) IgG it isn't possible to find enough samples negative for Epstein-Barr Virus (VCA) IgG but positive for other herpesviridae, to evaluate the specificity. But with the use of reference material from external quality control departments (INSTAND e.V.), reference samples as well as defined EBV panels we could confirm that our used antigen is specific for Epstein-Barr Virus (VCA) IgG.

9.3 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the DRG ELISA was calculated by adding 2 standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of the negative control and was found to be 0.21 DU/mL ($OD_{450} = 0.011$).

9.4 Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. (Detected by method comparison with Virion-Serion ELISA, with three lots of DRG ELISA. 85 samples, therefrom 13 negative samples are assayed with DRG ELISA lot 1-3.) It is 100% (for all three lots).

9.5 Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. (Detected by method comparison with Virion-Serion ELISA, with three lots of DRG ELISA. 85 samples, therefrom 71 positive samples are assayed with DRG lot 1-3.) It is 98.61% (for all three lots).

9.6 Method Comparison

The DRG EBV (VCA) IgG ELISA was compared with another EBV (VCA) IgG ELISA (Virion-Serion). 85 serum samples are assayed.

n= 85		Virion Serion ELISA EBV VCA IgG	
		pos.	neg.
DRG ELISA	pos.	71	0
	neg.	1	13

Agreement: 98.82%

9.7 Reproducibility

9.7.1 Intra-assay

The intra-assay (within-run) precision of the DRG ELISA was determined by 20 x measurements of 12 serum samples covering the whole measuring range.

Sample	Mean OD_{450}	Intra-Assay CV (%)	n
1	0,35	8,37	20
2	0,27	5,01	20
3	0,35	7,07	20
4	0,88	6,17	20
5	0,98	3,01	20
6	0,97	1,82	20
7	1,34	5,35	20
8	1,16	9,87	20
9	0,98	4,36	20
10	1,86	5,13	20
11	2,68	6,06	20
12	2,69	4,46	20

9.7.2 Inter-assay

The inter-assay variation of the DRG ELISA was determined with 3 samples with 2 production kits in 10 independent runs with 2 replicates per run.

Sample	Mean OD ₄₅₀	Inter-Assay CV (%)	n
1	1,58	10,63	40
2	2,12	8,38	40
3	1,96	8,38	40

10 LIMITATIONS OF USE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. 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.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid.

Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES / LITERATUR

Bergman M., Gleckman R.A., "Heterophil-negative infectious mononucleosis-like syndrome".
Postgrad.Med., 81 (1): 313-326 (1987)

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)

Färber I., Wutzler P., Wohlrahe P. et al., "Serological diagnosis of infectious mononucleosis using three anti-Epstein-Barr virus recombinant ELISAs",
J. Virol. Meth.; 42: 301-308, (1993)

1 EINLEITUNG

Der **DRG EBV-VCA IgG ELISA** wird zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Epstein Barr Virus (VCA) in Humanserum und -Plasma eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der **DRG EBV-VCA IgG ELISA** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay.

Vertiefungen einer Mikrotiterplatte als Festphase sind mit inaktiviertem Epstein Barr Virus (VCA)-Antigen (Rek. Protein p18+p23) beschichtet. In diese Vertiefungen werden **verdünnte** Patientenproben und **gebrauchsfertige** Kontrollen pipettiert.

Während der darauf folgenden Inkubation werden Epstein Barr Virus (VCA)-spezifische Antikörper positiver Proben und Kontrollen an die immobilisierten Antigene gebunden.

Nach einem Waschvorgang zur Entfernung von nicht gebundenem Kontroll- und Probenmaterial wird Anti-human-IgG-Meerrettichperoxidase-Konjugat zugegeben, das sich während einer weiteren Inkubation spezifisch an IgG-Antikörper bindet und dadurch zur Bildung enzymmarkierter Immunkomplexe führt.

Durch einen zweiten Waschvorgang wird ungebundenes Konjugat entfernt.

Die (bei positiven Resultaten) gebildeten Immunkomplexe werden durch Inkubation mit TMB-Substrat anhand einer blauen Farbreaktion, die nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure in gelb umschlägt, sichtbar und messbar gemacht.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist der Anti-Epstein Barr Virus (VCA)-Antikörpermenge in der Patientenprobe direkt proportional.

Die Extinktionsmessung bei 450 nm erfolgt mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (ELISA-Reader).

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0,2 mol/L H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich. Die Sicherheitsdatenblätter entsprechen den EU-Verordnungen.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar);
Mit inaktiviertem Epstein Barr Virus (VCA)-Antigen (Rek. Protein p18+p23) beschichtet;
(inkl. 1 Streifenhalter und 1 Abdeckfolie)
2. **Sample Diluent** * (Probenverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 100 mL, gebrauchsfertig;
gelb gefärbt; pH 7,2 ± 0,2
3. **Pos. Control** * (Positive Kontrolle), 1 Fläschchen, 1,0 mL, gebrauchsfertig;
gelb gefärbt, rote Kappe.
4. **Neg. Control** * (Negative Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig;
gelb gefärbt, gelbe Kappe.
5. **Cut-off Control** * (Grenzwert-Kontrolle), 1 Fläschchen, 2,0 mL, gebrauchsfertig;
gelb gefärbt, schwarze Kappe.
6. **Enzyme Conjugate** * (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 20 mL, gebrauchsfertig;
rot gefärbt.
Antikörper gegen humanes IgG, mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
7. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Tetramethylbenzidin (TMB).
8. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält 0,2 mol/L H₂SO₄;
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
9. **Wash Solution** * (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, (**20X** konzentriert für 600 mL) pH 6,5 ± 0,1;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

* Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

4.1.1 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter, (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschorruchtung
- Vortex-Mischer
- Aqua dest.
- Kurzzeitwecker
- Saugfähiges Papier

4.2 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die *Microtiterwells* sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

4.3 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Wash Solution

Waschlösung **1 + 19** (z.B. 10 mL + 190 mL) mit frischem, keimfreiem destilliertem Wasser verdünnen. Diese verdünnte Waschlösung hat einen pH-Wert von 7,2 ± 0,2.

Bedarf: ca. 5 mL pro Bestimmung.

Kristalle in der Lösung durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C auflösen. Es muss sichergestellt sein, dass die Kristalle vollständig gelöst sind, bevor die Waschlösung verwendet wird.

Die verdünnte Waschlösung ist bei 2 °C bis 8 °C für 2 Wochen stabil.

4.4 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen zu diesem Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

4.5 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolytierte Proben sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulant enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 5 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren, bei -20 °C, bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

Vor Testbeginn müssen die Patientenproben **1 + 100** mit *Sample Diluent* verdünnt werden;

z.B. 10 µL Probe + 1 mL *Sample Diluent*, **gut mischen, 15 Minuten stehen lassen, nochmals gut mischen.**

Achtung: Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden!

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- **Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien, Proben und Kontrollen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur zu bringen!**
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Reagenzfläschchen sofort nach Gebrauch wieder sorgfältig verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu verhindern.
- Die Patientenproben bzw. das Konjugat sorgfältig auf den Boden der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren (ohne den Rand zu benetzen!), um Kreuzkontaminationen und fälschlich erhöhte Ergebnisse zu vermeiden.
- *Microtiterwells* während der 37°C Inkubation durch Abdecken mit Abdeckfolie vor Verdunstung schützen.

6.2 Testdurchführung

Vor Beginn der Testdurchführung die *Wash Solution* verdünnen, die **Patientenproben vorbereiten, wie unter Punkt 5.3 beschrieben** und auf dem mitgelieferten **Übersichtsplan** die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Kontrollen auf den Mikrotiterstreifen zur sicheren Identifizierung genau festlegen.

1. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

1 Vertiefung	(z.B. A1)	für den Substratleerwert (Blank),	
1 Vertiefung	(z.B. B1)	für die <i>Neg. Control</i>	
2 Vertiefungen	(z.B. C1 + D1)	für die <i>Cut-off Control</i>	und
1 Vertiefung	(z.B. E1)	für die <i>Pos. Control</i>	vorsehen.

Es bleibt dem Anwender überlassen, zur höheren Sicherheit für die Kontrollen und die Patientenproben Doppel- oder Mehrfachbestimmungen vorzusehen.

2. **100 µL *Neg. Control*** in Vertiefung B1 je
100 µL *Cut-off Control* in die Vertiefungen C1 und D1
100 µL *Pos. Control* in Vertiefung E1 und
100 µL jeder verdünnten Patientenprobe mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells pipettieren.
 Vertiefung A1 für den Substratleerwert (Blank) reservieren!
3. Die Mikrotiterstreifen mit der dem Testkit beiliegenden Folie abdecken.
60 Minuten bei 37 °C inkubieren.
4. Den Inhalt der Mikrotiterstreifen kräftig ausschütteln und **5-mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterstreifen auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Testes wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrittes!
5. **100 µL *Enzyme-Conjugate*** in jede Vertiefung geben, **außer in A1**.
6. Die Mikrotiterstreifen **30 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C)** inkubieren.
Testansatz nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen!
7. Den Inhalt der Mikrotiterstreifen kräftig ausschütteln und **5-mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterstreifen auf saugfähigem Papier entfernen.
8. **100 µL *Substrate Solution*** in jede Vertiefung geben.
9. Die Mikrotiterstreifen **15 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) im Dunkeln** inkubieren
10. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL *Stop Solution*** in jede Vertiefung abstoppen.
 Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.
Hinweis: Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen!
11. Die Optische Dichte bei **450/620 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **30 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

6.3 Messung

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

Falls diese Kalibrierung 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 Vertiefungen bei 450 nm messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in den Übersichtsplan eintragen.

Eine bichromatische Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

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

7 ERGEBNISSE

7.1 Qualitätskontrollkriterien und Testvalidität

Die Testdurchführung ist gültig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

Substrat-Leerwert in A1:	Extinktion niedriger als 0,100
Neg. Control in B1:	Extinktion niedriger als 0,200
Cut-off Control in C1 und D1:	Extinktionen zwischen 0,350 und 0,850
Pos. Control in E1:	Extinktion zwischen 0,650 und 3,000

7.2 Testauswertung

Extinktionsmittelwert der Grenzwert-Kontrolle (*Cut-off Control*) [CO]

Den Extinktionsmittelwert der 2 Grenzwert-Kontroll-Bestimmungen (z.B. in C1/D1) berechnen.

Beispiel: $(0,44 + 0,46)/2 = 0,45 = CO$

7.3 Interpretation

POSITIV Patienten-Extinktions(mittel)werte mehr als 10% oberhalb des CO.
(Mittlere OD Probe $> 1,1 \times CO$)

GRAUZONE Patienten-Extinktions(mittel)werte von 10 % oberhalb bis zu 10 % unterhalb des CO.
Test 2 - 4 Wochen später wiederholen - mit frischer Patientenprobe.
($0,9 \times CO \leq \text{Mittlere OD Probe} \leq 1,1 \times CO$)
Ergebnisse im zweiten Test wieder in der Grauzone \Rightarrow **NEGATIV**.

NEGATIV Patienten-Extinktions(mittel)werte mehr als 10 % unterhalb des CO
(Mittlere OD Probe $< 0,9 \times CO$)

7.3.1 Ergebnisse in DRG Units [DU]

$\frac{\text{Patienten-Extinktions(mittel)wert} \times 10}{CO} = [\text{DRG Units} = \text{DU}]$

Example: $\frac{1,580 \times 10}{0,45} = 35 \text{ DU}$

Interpretation der Ergebnisse

Cut-off-Wert:	10 DU
Grauzone:	9 - 11 DU
Negativ:	< 9 DU
Positiv:	> 11 DU

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Wenn die Ergebnisse des Testes nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,21 DU – 60 DU/mL.

9.2 Spezifität des Antigens (Kreuzreaktivität)

Aufgrund der hohen Seroprävalenz von Epstein-Barr Virus (VCA) IgG, ist es leider nicht möglich ausreichend negative Proben für diesen Parameter zu finden, die aber positive für andere Herpesviridae sind, so dass die Ermittlung der Antigen-Spezifität nicht wie üblich gemessen werden kann.

Durch die Austestung von Referenzmaterial von externen QC Laboratorien (INSTAND e.V.), DRG eigenem Referenzmaterial und definierten EBV Panels können wir bestätigen, dass unser verwendetes Antigen spezifisch für Epstein-Barr Virus (VCA) IgG ist.

9.3 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung der neg. Kontrolle (n = 20), beträgt 0,21 DU (OD₄₅₀ = 0,011).

9.4 Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. (Ermittelt durch einen Vergleich mit Virion-Serion EBV (VCA) IgG ELISA über 3 DRG Produktionschargen mit 85 Proben, davon 13 negative für DRG Charge 1-3.)

Sie beträgt 100% (für alle 3 Chargen).

9.5 Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. (Ermittelt durch einen Vergleich mit Virion-Serion EBV (VCA) IgG ELISA über 3 DRG Produktionschargen mit 85 Proben, für DRG Charge 1-3, davon 71 positive)

Sie beträgt 98.61% (für alle 3 Chargen).

Die Daten zu:

9.6 Methodenvergleich

9.7 Reproduzierbarkeit (Präzision)

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung (Seite 9 und 10).

10 GRENZEN DES TESTES

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in Punkt 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

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.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

12 REFERENZEN / LITERATUR

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

1 INTRODUZIONE

L'immunoassay enzimatico **DRG EBV-VCA IgG ELISA** fornisce materiale per la determinazione **qualitativa e semiquantitativa** di anticorpi della classe IgG per Epstein Barr Virus (VCA) nel siero e plasma.

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit **DRG EBV-VCA IgG ELISA** è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati.

Micropozzetti come fase solida sono ricoperti con l'antigene Epstein Barr Virus (VCA) (rec. Proteina p18+p23).

Campioni diluiti di pazienti e **controlli pronti all'uso** sono pipettati in questi micropozzetti.

Durante l'incubazione gli anticorpi specifici contro Epstein Barr Virus (VCA) di campioni positivi e dei controlli si legano agli antigeni immobilizzati. Dopo i passaggi di lavaggio per rimuovere materiali dei campioni e controlli non legati, anticorpi anti-IgG umano coniugati alla perossidasi di rafano sono aggiunti ai pozzetti.

Durante una seconda incubazione questi coniugati anti-IgG si legano in maniera specifica agli IgG anticorpi, risultando nella formazione di complessi immunologici-enzimatici.

Dopo un secondo passaggio di lavaggio per rimuovere coniugati non legati, i complessi immunologici formati (nel caso di risultati positivi) sono evidenziati dalla incubazione del substrato TMB e da conseguente sviluppo di un colore blu. Il colore blu vira nel giallo dopo l'arresto della reazione enzimatica indicatore con acido sulfidrico.

L'intensità di questo colore è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpo IgG Epstein Barr Virus (VCA)-specifico nel campione del paziente. L'assorbanza a 450 nm viene determinata con un spettrofotometro ELISA per micropozzetti.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0,2 mol/L H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati magazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DRG Instruments GmbH. I regolamenti di sicurezza corrispondono alle norme EU.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozetti), 12x8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti
Pozzetti ricoperti con Epstein Barr Virus (VCA) antigene (rec. Proteina p18+p23),
(include 1 supporto per pozzetti e 1 fogli di copertura)
2. **Sample Diluent** * (Diluente dei campioni), 1 flacone, 100 mL, pronto all'uso,
colore giallo, pH 7.2 ± 0.2 .
3. **Pos. Control** * (Controllo positivo), 1 flacone, 1.0 mL, pronto all'uso;
colore giallo, tappo rosso.
4. **Neg. Control** * (Controllo negativo), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso;
colore giallo, tappo giallo.
5. **Cut-off Control** * (Controllo valore limite), 1 flacone, 2.0 mL, pronto all'uso;
colore giallo, tappo nero.
6. **Enzyme Conjugate** * (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 20 mL, pronto all'uso;
colore rosso,
anticorpo a IgG umano coniugato alla perossidasi di rafano.
7. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso
TMB (benzidine tetrametilico).
8. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
contiene 0.2 mol/L H_2SO_4
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
9. **Wash Solution** * (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (20 X concentrato per 600 mL), pH 6.5 ± 0.1
vedi „Preparazione dei reagenti“.

* Contiene conservante senza mercurio.

4.1.1 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450 ± 10 nm) (p.es. il DRG Instruments Microtiterplate Reader).
- Micropipette di precisione variabili, calibrati
- Incubatore a $37^\circ C$
- Materiale per il lavaggio automatico o manuale
- Agitatore vortex
- Acqua deionizzata o (al momento) distillata
- Cronometro
- Carta assorbente

4.2 Magazzinaggio e stabilità del kit

A $2^\circ C$ a $8^\circ C$ i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a $2^\circ C$ a $8^\circ C$. I micropozzetti devono essere magazzinati a $2^\circ C$ a $8^\circ C$. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kit aperti rimangono attivi per due mesi se magazzinati come descritto sopra.

4.3 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Wash Solution

Diluire la **Wash Solution 1 + 19** (p.es. 10 mL + 190 mL) con acqua sterile ridistillata. Il valore pH in base a diluizione è $7,2 \pm 0,2$.

Consumo: ~ 5 mL per determinazione.

I cristalli nella soluzione si sciolgono durante il riscaldamento a $37^\circ C$ in bagnomaria. Assicurarsi che i cristalli siano completamente dissolti prima dell'uso.

La **Wash Solution diluita** è stabile per 4 settimane a $2^\circ C$ a $8^\circ C$.

4.4 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza.

4.5 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DRG, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere immagazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero o plasma può essere usato per questo test.
Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

5.1 Collezione dei campioni

Siero:
Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.
Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma:
Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante (p. es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere immagazzinati ben chiusi fino a 5 giorni a 2 °C a 8 °C prima dell'utilizzo.
Campioni immagazzinati per un periodo più lungo dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi.
Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3 Diluizione dei campioni

Prima dell'utilizzo diluire ogni campione dei pazienti **1 + 100** con il *Sample Diluent*,
P.es. 10 µL del campione + 1 mL del *Sample Diluent* **agitare bene; lasciare stare per 15 minuti, agitare bene.**

Nota bene: Controlli sono pronti all'uso e non devono essere diluiti!

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- **È molto importante portare tutti i reagenti, campioni e controlli a temperatura ambiente prima dell'esecuzione del test!**
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.
- Chiudere bene i flaconi dei reagenti immediatamente dopo l'uso per evitare l'evaporazione e la contaminazione microbica.
- Per evitare contaminazioni incrociate e risultati falsi pipettare i campioni e il tracciante sul fondo del pozzetto.
- Durante l'incubazione 37 °C coprire i pozzetti per evitare l'evaporazione.

6.2 Eseguito del test

Prima d' iniziare con il test i **campioni dei pazienti da preparare com'è descritto del punto 5.3, agitare bene** e diluire la *Wash Solution* e si dovrebbe eseguire un piano di distribuzione ed identificazione per tutti i campioni e controlli sul prestampato fornito nel kit.

1. Selezionare il numero richiesto di strips o pozzetti e inserirli sul sostegno.

Si prega di collocare almeno:

- | | | |
|--------------------------|------------------------------|---|
| 1 pozzetto (p.es. A1) | per il bianco, | |
| 1 pozzetto (p.es. B1) | per il <i>Neg. Control</i> | |
| 2 pozzetti (p.es. C1 D1) | per il <i>Neg. Control</i> | e |
| 1 pozzetto (p.es. D1) | per il <i>Pos. Control</i> . | |

È lasciato all'operator di determinare i controlli e i campioni in doppio.

2. Aggiungere
 - 100 µL** del *Neg. Control* nei pozzetto B1
 - 100 µL** del *Cut-off Control* nei pozzetti C1 + D1
 - 100 µL** del *Pos. Control* nel pozzetto E1 e
 - 100 µL** di ogni campione diluito con una nuova punta nei rispettivi pozzetti.
 Lasciare il pozzetto A1 vuoto per il bianco!
3. Coprire i pozzetti con la foglia fornita nel kit. Incubare per **60 minuti a 37°C**.
4. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **5 volte** con *Wash Solution* diluita (**300 µL in ogni pozzetto**). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante: La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto eseguito del lavaggio!
5. Aggiungere **100 µL** del *Enzyme Conjugate* in ogni pozzetto, **eccetto A1**.
6. Incubare per **30 minuti a temperatura ambiente (20°C a 25°C)**.
Non esporre alla luce solare diretta!
7. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **5 volte** con *Wash Solution* diluita (300 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
8. Aggiungere **100 µL** di *Substrate Solution* in ogni pozzetti.
9. Incubare per **15 minuti esattamente a temperatura ambiente (20°C a 25°C) al buio**.
10. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della *Stop Solution* in ogni pozzetto.
Il colore blu sviluppato vira al giallo.
Nota: Nei campioni fortemente positivi si può formare un precipitato scuro del cromogeno!
11. Determinare la densità ottica a **450/620 nm** con un fotometro **entro 30 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Misure fotometriche

Azzerare lo strumento ELISA per micropiastre utilizzando il **bianco nel pozzetto A1**.

Se per motivi tecnici il fotometro ELISA non può essere azzerato utilizzando il bianco nel pozzetto A1, si deve sottrarre l'assorbanza il valore del pozzetto A1 da tutti gli altri valor misurati per ottenere risultati reali!

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e riportare i valori di tutti i campioni e controlli del piano di distribuzione ed identificazione.

Determinazione a doppio raggio usando 620 nm come lunghezza d'onda di riferimento è raccomandabile.

Dove possibile calcolare il **valore medio di valori di assorbanza** per tutti i campioni in doppio.

7 RESULTATI

7.1 Convalidazione del test

Il test può essere considerato valido se i seguenti criteri sono realizzati:

- Valor bianco in A1:** Assorbanza **inferiore a 0,100**
Neg. Control in B1: Assorbanza **inferiore a 0,200**
Cut-off Control in C1/D1: Valor di assorbanza **tra 0,350 - 0,850**
Pos. Control in E1: Valor di assorbanza **tra 0,650 – 3,000**

7.2 Calcolo

Il valore medio del Controllo valore limite [CO]

Calcolare il valore medio di assorbanza dei due (2) Controlli valore limite (p.es. In C1/D1).

Esempio: $(0,44 + 0,46)/2 = 0,45 = CO$

7.3 Interpretazione

- POSITIVI** Valori (medi) di assorbanza dei pazienti almeno 10 % sopra il CO
(Medio $DO_{\text{paziente}} > 1,1 \times CO$)
- ZONA GRIGIA** Valori (medi) di assorbanza da 10 % sopra a 10 % sotto il valore CO
ripetere il test 2-4 settimane dopo - con nuovi campioni dei pazienti.
 $(0,9 \times CO \leq DO_{\text{medio paziente}} \leq 1,1 \times CO)$
Risultati del secondo test nuovamente nella zona grigia \Rightarrow **NEGATIVI**
- NEGATIVI** Valori (medi) di assorbanza almeno 10 % inferiore a CO
(Medio $DO_{\text{paziente}} < 0,9 \times CO$)

7.3.1 Risultati in unità DRG [DU]

$\frac{\text{valori (medi) di assorbanza dei pazienti} \times 10}{CO} = [\text{DRG Units} = \text{DU}]$

Esempio: $\frac{1,580 \times 10}{0,45} = 35 \text{ DU}$

Interpretazione dei risultati

Valore di soglia:	10	DU
Zona grigia:	9 - 11	DU
Negativi:	< 9	DU
Positivi:	> 11	DU

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge.

Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno.

Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

È consigliabile di utilizzare programmi di valutazione di qualità nazionali o internazionali per assicurarsi la precisione dei risultati.

Se i risultati del test non entrano nel campo dei controlli stabiliti, i risultati dei campioni dei pazienti dovrebbero essere considerati invalidi.

In questo caso si prega di controllare i seguenti parametri tecnici: calibrazione delle micropipette e dei cronometri; spettrofotometro, date di scadenze dei reagenti, magazzinaggio e condizione di incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DRG.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0,21 – 60 DU/mL.

9.2 Specificità degli antigeni (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi più due deviazioni standard di venti (20) repliche dello *Neg. Control* ed erano 0,21 DU ($OD_{450} = 0,011$).

9.4 Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è definita come la probabilità del test di dare risultati negativi con l'assenza del reagente analitico. È 100%. Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.5 Sensitività diagnostica

La sensitività diagnostica è definita come la probabilità del test di dare risultati positivi con la presenza del reagente specifico. È 98,61%. Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.6 Comparazione dei Metodi

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.7 Precisione

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

10 LIMITAZIONI

Contaminazioni batteriche o ripetuti cicli di congelamento e scongelamento dei campioni possono influenzare i valori di assorbanza.

Per pazienti immunosoppressi e per neonati i dati sierologici hanno una validità ristretta.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DRG.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. La diagnosi di una malattia infettiva non dovrebbe essere fondata sulla base di un solo risultato del test. La diagnosi precisa dovrebbe considerare la storia clinica, la sintomatologia e i dati sierologici.

Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.

Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2.

Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

12 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Uso previsto

El kit de inmunoensayo enzimático **EBV-VCA IgG ELISA de DRG** proporciona los materiales necesarios para la detección **cualitativa** y semicuantitativa de anticuerpos de clase IgG contra Epstein-Barr Virus (VCA) en suero humano y plasma.

Esta prueba solo está prevista para uso diagnóstico *in vitro*.

2 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El kit de **EBV-VCA IgG ELISA** de DRG es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de fase sólida (ELISA). Los pocillos en fase sólida se revisten con antígeno soluble de Epstein-Barr Virus (VCA) inactivo (rec. Proteína p18+p23). Las muestras **diluidas de pacientes** y los **controles listos para utilizar** se pipetean en estos pocillos. Durante la incubación, los anticuerpos específicos del Epstein-Barr Virus (VCA) de las muestras y controles positivos se unen a los antígenos inmovilizados.

Tras una fase de lavado para eliminar la muestra que no se ha unido y el material de control, los anticuerpos IgG antihumanos conjugados con peroxidasa de rábano se depositan en los pocillos. Durante una segunda incubación, este conjugado de antiIgG se une específicamente a los anticuerpos IgG, lo que resulta en la formación de complejos inmunes ligados a enzimas.

Tras una segunda fase de lavado para eliminar los conjugados que no se han unido, se detectan los complejos inmunes formados (en el caso de los resultados positivos) a través de la incubación con sustrato de TMB y del desarrollo de un color azul. El color azul se vuelve amarillo cuando se detiene la reacción del indicador enzimático con ácido sulfúrico. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo IgG contra Epstein-Barr Virus (VCA) en la muestra del paciente. La absorbencia a 450 se lee mediante un lector de placas de ELISA.

3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Este kit solo es para uso diagnóstico *in vitro*. Solo para uso profesional.
- Antes de comenzar la prueba, leer las instrucciones completamente y con atención. Utilizar la versión válida del prospecto que se incluye en el kit. Asegurarse de que comprende todo.
- Todos los reactivos de este kit de prueba que contengan suero o plasma humano se han analizado y se ha confirmado que los resultados son negativos para VIH I/II, HBsAg y VHC de acuerdo con los procedimientos aprobados por la FDA. No obstante, todos los reactivos se deben manipular y desechar como si supusiesen un riesgo biológico.
- Evitar contacto con la solución de parada de 0,2 mol/L H₂SO₄. Puede causar irritación cutánea y quemaduras.
- El sustrato de TMB produce un efecto irritante en la piel y las mucosas. En caso de contacto, lavarse los ojos con abundante agua y la piel con jabón y abundante agua. Lavar los objetos contaminados antes de volver a utilizarlos. En caso de inhalación, llevar a la persona afecta al exterior.
- La microplaca contiene tiras separables. Los pocillos no utilizados deben almacenarse de 2 °C a 8 °C en la bolsa sellada de papel de aluminio y deben utilizarse en la estructura provista para tal fin.
- El pipeteo de las muestras y los reactivos debe realizarse tan rápido como sea posible y siguiendo el mismo patrón en cada paso.
- Utilizar los reservorios únicamente para los reactivos individuales. Esto afecta a los reservorios de sustratos. La utilización de un reservorio para depositar una solución de sustrato que se ha usado anteriormente para la solución conjugada puede teñir la solución. No verter de nuevo los reactivos en los viales para que no contaminar la sustancia.
- Mezclar los contenidos de los pocillos de las microplacas enérgicamente para garantizar unos buenos resultados de la prueba. No utilizar de nuevo los micropocillos.
- No dejar que se sequen los pocillos durante la prueba, añadir los reactivos inmediatamente después de finalizar la fase de enjuague.
- Permitir que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (de 21 °C a 26 °C) antes de comenzar la prueba. La temperatura afectará las lecturas de absorbencia de la prueba. Sin embargo, los valores de las muestras de los pacientes no se verán afectados.
- No pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y de las muestras con la piel y con las mucosas.
- No fumar, comer, beber ni aplicarse productos cosméticos en zonas donde se manipulen muestras o reactivos del kit.
- Utilizar guantes desechables de látex al manipular las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos y las muestras puede provocar resultados falsos.
- La manipulación debe realizarse conforme a los procedimientos definidos por la legislación o las pautas de seguridad ante riesgos biológicos nacionales que procedan.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta del kit.
- Todos los volúmenes indicados deben realizarse conforme al protocolo. Los resultados de las pruebas solo serán óptimos si se utilizan pipetas y lectores de placas graduados.
- No mezclar ni utilizar componentes de kits que tengan un número de lote diferente. Se recomienda no intercambiar pocillos en distintas placas incluso si pertenecen al mismo lote. Puede que los kits se hayan transportado o almacenado en distintas condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar ligeramente distintas.

- Las sustancias químicas y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como desechos peligrosos de acuerdo con la legislación o las pautas en materia de seguridad ante riesgos biológicos nacionales.
- Para más información sobre las sustancias peligrosas que se incluyen en el kit, consultar la ficha de datos de seguridad. La ficha de datos de seguridad de este producto se puede solicitar directamente a DRG.

4 REACTIVOS

4.1 Reactivos incluidos

1. **Microtiterwells** (Micropocillos), 12 x 8 tiras (separables), 96 pocillos; pocillos revestidos con antígeno de Epstein-Barr Virus (VCA) inactivo (rec. Proteína p18+p23) (incluye 1 soporte para las tiras y 1 lámina para cubierta).
2. **Sample Diluent** (Diluyente de muestras)*, 1 vial, 100 mL, listo para su uso, de color amarillo; pH $7,2 \pm 0,2$.
3. **Pos. Control** (Control positivo) *, 1 vial, 1,0 mL, listo para su uso; de color amarillo, con tapón rojo.
4. **Neg. Control** (Control negativo) *, 1 vial, 2,0 mL, listo para su uso; de color amarillo, con tapón amarillo.
5. **Cut-off Control** (Control límite) *, 1 vial, 2,0 mL, listo para su uso; de color amarillo, con tapón negro.
6. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático) *, 1 vial, 20 mL, listo para su uso, de color rojo, anticuerpo al conjugado IgG humano a la peroxidasa de rábano.
7. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, lista para su uso, tetrametilbencidina (TMB).
8. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, lista para su uso, contiene 0,2 mol/L H_2SO_4 , Evitar el contacto con la solución de parada. Puede causar irritación cutánea y quemaduras.
9. **Wash Solution** (Solución de lavado) *, 1 vial, 30 mL (20x concentrado para 600 mL), pH $6,5 \pm 0,1$ consulte «Preparación de reactivos».

* Contiene conservantes que no son de mercurio.

4.1.1 Material necesario pero no proporcionado

- Un lector graduado de placas (450/620 nm ± 10 nm) (i.e. el lector de placas de instrumentos DRG).
- Micropipetas de precisión con variables calibradas.
- Incubador a 37 °C.
- Equipo manual o automático para enjuagar los pocillos.
- Agitador de tubos vorticiales.
- Agua desionizada o (recientemente) destilada.
- Cronómetro.
- Papel absorbente.

4.2 Condiciones de almacenaje

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha. Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo. Los kits abiertos conservan su actividad durante dos meses si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.3 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Solución de lavado

Diluir **1+19** de la solución de lavado (es decir, 10 mL +190 mL) con agua redestilada aséptica. La solución de enjuague diluida tiene un valor de pH de $7,2 \pm 0,2$.

Consumo: ~ 5 mL por determinación.

Los cristales de la solución desaparecen al calentarlos a 37 °C al baño maría. Asegurarse de que los cristales se han disuelto por completo antes de utilizarlo.

La solución de lavado diluida permanece estable durante 4 semanas de 2 °C a 8 °C.

4.4 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.5 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DRG, no más tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

En esta prueba se puede utilizar suero o plasma.
No utilizar muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas.

5.1 Toma de muestras

Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

Plasma:

Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrifuga que contengan anticoagulante (Ej. Sarstedt Monovette con una preparación adecuada para el plasma) y centrifugar inmediatamente tras la recogida.

5.2 Almacenamiento y preparación de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 5 días a 2 °C a 8 °C antes del ensayo. Las muestras almacenadas por un período de tiempo más largo han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

Antes de analizar cada muestra, diluirla con el *diluyente para muestras*.

Diluir cada muestra de paciente (**1+100**) con *diluyente para muestras*, es decir, 10 µL de muestra + 1 mL de *diluyente para muestras*. **Mezclar bien. Dejarlo reposar durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente, mezclar bien.**

Atención: Los controles están listos para su utilización y no se deben diluir.

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- **Es muy importante que todos los reactivos, muestras y controles estén a temperatura ambiente antes de empezar la prueba.**
- Una vez que se ha iniciado la prueba, se deben completar todos los pasos sin interrupciones.
- Utilizar puntas de pipetas desechables nuevas para cada calibrador, control o muestra para evitar que se produzca contaminación cruzada.
- La absorbencia es una función del tiempo y la temperatura de incubación. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén listos, destapados, todos los pocillos bien colocados en el soporte, etc. Esto garantizará que trascurra el mismo tiempo en cada paso de la fase de pipeteo sin interrupciones.
- Como normal general, la reacción enzimática es directamente proporcional al tiempo y la temperatura.
- Cerrar los viales de reactivos inmediatamente tras su uso para evitar su evaporación y la contaminación microbiana.
- Para evitar que se produzca contaminación cruzada y que se obtengan unos resultados elevados falsos, pipetear las muestras de pacientes y depositar el conjugado sin salpicar el fondo de los pocillos.
- Durante la incubación a 37 °C, cubrir las tiras con papel de aluminio para evitar que se evaporen.

6.2 Procedimiento de ensayo

Antes de comenzar el ensayo, diluir la *solución de lavado*, **preparar las muestras de pacientes tal y como se describe en el punto 5.3** y establecer detenidamente el **plan de distribución e identificación** que se incluye en el kit para todas las muestras y controles.

1. Seleccionar el número necesario de tiras y pocillos e insertarlos en el soporte.

Distribuir al menos:

1 pocillo	(i.e. A1)	para el control blanco de sustrato,
1 pocillo	(i.e. B1)	para el <i>control negativo</i> ,
2 pocillos	(i.e. C1+D1)	para el <i>control límite</i> y
1 pocillo	(i.e. E1)	para el <i>control positivo</i> .

Es decisión del usuario determinar si se duplican los controles y las muestras de pacientes.

2. Depositar

100 µL de <i>control negativo</i>	en el pocillo	B1
100 µL de <i>control límite</i>	en los pocillos	C1 y D1
100 µL de <i>control positivo</i>	en el pocillo	E1

 y
100 µL de cada muestra diluida con puntas desechables nuevas en los pocillos correspondientes.
 Dejar el pocillo A1 para el *control blanco de sustrato*.
3. Cubrir los pocillos con el papel de aluminio que se incluye en el kit. Incubar durante **60 minutos a 37 °C**.
4. Agitar enérgicamente el contenido de los pocillos.
 Enjuagar los pocillos **5 veces** con la solución de lavado diluida (**300 µL por cada pocillo**). Golpear con fuerza los pocillos en papel absorbente para eliminar cualquier gota restante.
Nota importante:
 El límite inferior de detección y la precisión de este ensayo están muy relacionados con la correcta realización del procedimiento de lavado.
5. Depositar **100 µL** de conjugado enzimático en cada pocillo, **excepto en el A1**.
6. Incubar durante **30 minutos a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C)**.
No exponer directamente a la luz solar.
7. Agitar enérgicamente el contenido de los pocillos.
 Enjuagar los pocillos **5 veces** con la solución de lavado diluida (300 µL por cada pocillo). Golpear con fuerza los pocillos en papel absorbente para eliminar cualquier gota restante.
8. Añadir **100 µL** de *solución de sustrato a todos* los pocillos.
9. Incubar **exactamente durante 15 minutos a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C) en un lugar oscuro**.
10. Detener la reacción enzimática añadiendo **100 µL** de *solución de parada* a cada pocillo.
 Todos los elementos que se volvieron azules durante la incubación se tornarán amarillos.
Nota: En las muestras de pacientes que presente un nivel positivo alto pueden formar precipitados oscuros en el cromógeno.
11. Leer la densidad óptica a **450/620 nm** con un lector de placas en los **30 minutos posteriores** a haber añadido la *solución de parada*.

6.3 Medición

Ajustar el lector de microplacas o microtiras de ELISA a **cero** mediante el **control blanco de sustrato del pocillo A1**. Si, debido a motivos técnicos, el lector de ELISA no puede ajustarse a cero mediante el control blanco de sustrato del pocillo A1, restar el valor de absorbencia del pocillo A1 del resto de valores de absorbencia medidos para obtener unos resultados fiables.

Medir la absorbencia de todos los pocillos a **450 nm** y registrar los valores de absorbencia de cada control y muestra de paciente del plan de distribución e identificación.

Se recomienda la lectura de la longitud de onda dual utilizando 620 nm como referencia.

Donde proceda, **calcular los valores de absorbencia promedio** de todos los duplicados.

7 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

7.1 Validación de la prueba

La prueba se considerará como válida cuando se cumplan los siguientes criterios:

Control blanco de sustrato en A1:	Nivel de absorbencia inferior a 0,100.
Control negativo en B1:	Nivel de absorbencia inferior a 0,200.
Control límite en C1/D1:	Nivel de absorbencia entre 0,350 – 0,850
Control positivo en E1:	Nivel de absorbencia entre 0,650 – 3,000

7.2 Cálculo

Valor de absorbencia promedio del control límite [CL]

Calcular el valor de absorbencia promedio de las (2) determinaciones del control límite (i.e. en C1/D1).

Ejemplo: $(0,44 + 0,46)/2 = 0,45 = CL$

7.3 Interpretación

NEGATIVO	DO promedio del paciente < CL DO – 10%
RESULTADO DUDOSO	CL DO - 10% ≤ DO promedio del paciente ≤ CL DO + 10% Repetir la prueba de 2 a 4 semanas después con nuevas muestras del paciente. Los resultados de la segunda prueba siguen siendo dudosos → NEGATIVO.
POSITIVO	DO promedio del paciente > CL DO + 10 %

7.3.1 Resultados en las unidades DRG [DU]

$\frac{\text{Valor de absorbencia (promedio) del paciente} \times 10}{CL} = [\text{unidades DRG} = DU]$

Ejemplo: $\frac{1,580 \times 10}{0,45} = 35 \text{ UD}$

7.3.2 Interpretación de los resultados en DU/mL

NEGATIVO:	< 9 DU/mL
VALOR LÍMITE:	10 DU/mL
RESULTADO DUDOSO (equivoco):	9 -11 DU/mL
POSITIVO:	> 11 DU/mL

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar las muestras de control conforme a la legislación regional y nacional. Se recomienda el uso de las muestras de control para garantizar la validez diaria de los resultados. Utilizar los controles tanto a nivel normal como patológico.

También se recomienda hacer uso de los programas de evaluación de la calidad a nivel nacional e internacional para garantizar la exactitud de los resultados.

Si los resultados del ensayo no cumplen los rangos estipulados de los materiales de controles, estos se deberán considerar como no válidos.

En ese caso, comprobar los siguientes aspectos técnicos: Los dispositivos de pipeteo y de temporización, los fotómetros, las fechas de caducidad de los reactivos, las condiciones de almacenamiento e incubación y los métodos de aspiración y lavado.

Tras comprobar los aspectos anteriores y no haber detectado ningún error, contactar con el distribuidor o con DRG directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,21 - 60 DU/mL.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar las instrucciones de uso en inglés

9.3 Límite inferior de detección analítico

El límite inferior de detección analítica de ELISA de DRG se calculó mediante la adición de 2 desviaciones estándar del promedio de 20 análisis duplicados del control negativo y cuyo resultado fue 0,21 DU/mL ($DO_{450} = 0,011$).

9.4 Especificidad del diagnóstico

La especificidad del diagnóstico se define como la probabilidad de que el ensayo dé un resultado negativo si no hay un análisis específico. (Detectado con el método de comparación Virion-Serion ELISA, con tres lotes de ELISA de DRG. 85 muestras, de las cuales 13 han dado como resultado negativo, se han analizado con el lote de ELISA de DRG 1-3). Es 100% (para los tres lotes).

9.5 El límite inferior de detección diagnóstica

El límite inferior de detección diagnóstica se define como la probabilidad de que el ensayo dé un resultado positivo si hay un análisis específico. (Detectado con el método de comparación Virion-Serion ELISA, con tres lotes de ELISA de DRG. 85 muestras, de las cuales 71 han dado como resultado positivo, se han analizado con el lote DRG 1-3). Es 98.61% (para los tres lotes).

Para más información sobre

9.6 Comparación de métodos

9.7 Reproducibilidad

consultar las instrucciones de uso en inglés.

10 LIMITACIONES DE USO

La contaminación bacteriana o los ciclos repetidos de congelación-descongelación de la muestra pueden afectar a los valores de absorbencia.

Los datos serológicos de los pacientes inmunocomprometidos y los recién nacidos solo tiene valor restringido.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Más aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DRG.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no se determinará con el resultado de una sola prueba. Un diagnóstico preciso debe contemplar la historia clínica, la sintomatología y los datos serológicos.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad











Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

















12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA

Consultar el manual de usuario en inglés.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consultez le Mode d'emploi	Consulte las Instrucciones	Consulti le istruzioni
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de microtitration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard 0	Estándar 0	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Pos. Control</i>	Positive Control	Positive Kontrolle	Positif Contrôle	Control positivo	Controllo positivo
<i>Neg. Control</i>	Negative Control	Negative Kontrolle	Négatif Contrôle	Control negativo	Controllo negativo
<i>Cut-off Control</i>	Cut-off Control	Grenzwert-Kontrolle	Valeur limite Contrôle	Control valor limite	Controllo valore limite
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante

SHORT INSTRUCTIONS FOR USE

	<p>All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature (18 °C – 25 °C) before use.</p>
	<p>Leave well A1 for substrate Blank. Dispense 100 µL of Controls into appropriate wells.</p>
	<p>Dispense 100 µL of sample into selected wells. (Please note special sample treatment, point 5.3!)</p>
	<p>Cover wells with foil. Incubate for 60 minutes at 37 °C.</p>
	<p>Briskly shake out the contents of the wells.</p>
	<p>Rinse the wells 5 times with diluted <i>Wash Solution</i> (300 µL per well).</p>
	<p>Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.</p>
	<p>Dispense 100 µL of <i>Enzyme Conjugate</i> into each well.</p>
	<p>Incubate for 30 minutes at room temperature.</p>
	<p>Briskly shake out the contents of the wells.</p>
	<p>Rinse the wells 5 times with diluted <i>Wash Solution</i> (300 µL per well).</p>
	<p>Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.</p>
	<p>Add 100 µL of <i>Substrate Solution</i> to each well.</p>
	<p>Incubate for 15 minutes at room temperature.</p>
	<p>Stop the reaction by adding 100 µL of <i>Stop Solution</i> to each well.</p>
	<p>Determine the absorbance of each well at 450 nm.</p>