

Chlamydia trachomatis IgA

**Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for
the qualitative
determination of IgA antibodies to
Chlamydia Trachomatis
in human serum and plasma**

- for "in vitro" diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

Chlamydia Trachomatis IgA

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the qualitative determination of IgA antibodies to Chlamydia Trachomatis in human plasma and sera. The product is intended for the follow-up of patients showing pathologies referable to Chl. Trachomatis infection. For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

Chlamydia trachomatis is a bacterium-like obligate intracellular organism that counts at least 15 recognized serotypes. C.trachomatis is one of the three distinct species within the genus Chlamydia (trachomatis, psittaci and pneumoniae). C.trachomatis infection in adults is responsible of most of sexually acquired urethritis in men, mucopurulent cervicitis in women, pelvic inflammatory disease, lymphogranuloma venereum, most of acute urethral syndromes, ocular infections, proctocolitis and epididymitis. In infants, the organism is responsible of pneumonia and conjunctivitis. Infections due to C.trachomatis stimulates the patient to generate a strong immunological response both in IgG, lasting a long time, and IgA, IgM whose presence is more correlated with an ongoing infection or a recent event. The determination of species-specific IgG, IgM and IgA is a helpful tool for the clinician to identify the infective agent and to decide the right therapy.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with a species-specific polypeptide derived from C.trachomatis major outer membrane antigen. In the 1st incubation, the solid phase is treated with diluted samples and anti-C.trachomatis IgA are captured, if present, by the antigens. After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti-C.trachomatis IgA are detected by the addition of anti hIgA antibody, labelled with peroxidase (HRP). The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti-C.trachomatis IgA antibodies present in the sample. IgA in the sample are then determined by a cut-off value able to discriminate between the negative and the positive population. Interferences due to IgG are blocked by means of a Neutralizing Reagent directly added to the sample in the well.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 microwells coated with CT a specific immunodominant synthetic antigen *in presence of bovine proteins*. Plates are sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

2. Negative Control: CONTROL -

1x4.0 ml/vial. Ready to use. It contains, human Serum negative for IgA antibodies to C. Trachomatis., 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The Negative Control is pale yellow color coded.

3. Positive Control: CONTROL +

1x4.0 ml/vial. Ready to use. It contains high titer human IgM antibodies positive to C. Trachomatis IgA, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The Positive Control is green color coded.

4. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle20x concentrated solution. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

5. Enzyme conjugate: CONJ

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

6. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

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

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

7. Sulphuric Acid: H2SO4 0.3 M

1x15ml/vialIt contains 0.3 M H₂SO₄ solution. Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

8. Specimen Diluent: DILSP

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

9. Neutralizing Reagent: SOLN NEUT

1x8ml/vial. It contains goat anti hIgG, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

10. Plate sealing foils n°2

11. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or

microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.

5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of storage. In this case call Dia.Pro's customer service.

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

Negative and Positive Controls

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

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: *Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.*

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

Sample Diluent

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

Neutralizing Reagent

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

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/-0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested). 5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing. An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of $\pm 5\%$.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter (620-630nm, mandatory) for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0 ; (c) linearity to ≥ 2.0 ; repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations

is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.

7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
6. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
7. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
8. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
9. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
10. Check that the micropipettes are set to the required volume.
11. Check that all the other equipment is available and ready to use.
12. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 μ l Sample Diluent + 10 μ l sample). Do not dilute the Controls as they are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.
3. Dispense 50 μ l of the Neutralizing Reagent (SOLN NEUT) in all the wells of the samples. Do not add it in the wells used for the Controls !

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

4. Dispense 100 μ l of Negative Control in triplicate and Positive Control in duplicate. Then dispense 100 μ l of diluted samples in each properly identified well.
5. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- Wash the microplate with an automatic as reported previously (section I.3).
- Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the A1 well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
- Wash microwells as in step 6.
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 10. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

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

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Neutralizing Reagent (only for samples)	50 µl
Controls	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm/620-630nm

An example of dispensation scheme for Qualitative Analysis is reported below:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 3										
B	CN	S 4										
C	CN	S 5										
D	CN	S 6										
E	CP	S 7										
F	CP	S 8										
G	S 1	S 9										
H	S 2	S 10										

Legenda: BLK = Blank CN = Negative Control
CP = Positive Control S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as qualified.

Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
Negative Control	< 0.150 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
Positive Control	OD450nm > 0.750 mean OD450nm value after blanking

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

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

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Sustrate solution has not got contaminated during the assay
Negative Control > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive calibrator instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative calibrator or of their wells has occurred due spills of positive samples or the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
Positive Control < 0.750 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

Important note:

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 12.

P. RESULTS

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

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

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

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as a ratio of the sample OD450nm/620-630nm value (S) and the cut-off value (Co), or S/Co, according to the following table:

S/Co	Interpretation
< 0.9	Negative
$0.9 \leq S/Co < 1.0$	Equivocal
≥ 1.0	Positive

A negative result indicates that the patient has not developed IgA antibodies to Chlamydia Trachomatis.

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

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

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
3. Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 12).

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

Negative Control: 0.080 – 0.120 – 0.080 OD450nm

Mean Value: 0.100 OD450nm

Lower than 0.150 – Accepted

Positive Control: 1.000 OD450nm

Higher than 0.750 – Accepted

Cut-Off = $0.100 + 0.250 = 0.350$

Sample 1: 0.080 OD450nm

Sample 2: 1.800 OD450nm

Sample 1 S/Co < 0.9 = negative

Sample 2 S/Co ≥ 1.0 = positive

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted on panels of positive and negative samples with reference to a CE marked reference kit.

1. Limit of detection

No international standard for C.trachomatis IgA antibody detection has been defined so far by the European Community. In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient with an history of Ch. Trachomatis infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The diagnostic performances were evaluated on samples supplied by two external centers, with excellent experience in the diagnosis of infectious diseases.

The diagnostic **sensitivity** was studied on more than 50 samples, positive with the reference kit. Positive samples were collected from patients with a clinical history of Chlamydia trachomatis infection.

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

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

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

Potentially interfering samples (pregnancy, emolyzed, lipemic, RF+) were tested.

No crossreaction was observed.

The Performance Evaluation provided the following values :

Sensitivity	> 98 %
Specificity	> 98 %

3. Precision:

It has been calculated on three samples, a negative, a low positive and a high positive, examined in 16 replicates in three separate runs for three lots.

Results are reported as follows:

CTA.CE: lot P1

Negative Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.051	0.051	0.053	0.051
Std.Deviation	0.0058	0.0065	0.0075	0.0066
CV %	11	13	14	12.6

Low Positive Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.767	0.766	0.788	0.773
Std.Deviation	0.037	0.039	0.039	0.038
CV %	4.8	5.1	4.9	4.9

High Positive Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.570	2.539	2.541	2.550
Std.Deviation	0.086	0.092	0.086	0.088
CV %	3.3	3.6	3.4	3.4

CTA.CE: lot P2

Negative Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.065	0.063	0.065	0.064
Std.Deviation	0.007	0.007	0.007	0.007
CV %	10.4	11.2	11.4	11

Low Positive Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.808	0.820	0.817	0.815
Std.Deviation	0.042	0.044	0.043	0.043
CV %	5.2	5.4	5.3	5.3

High Positive Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.604	2.584	2.597	2.595
Std.Deviation	0.124	0.128	0.119	0.124
CV %	4.8	4.9	4.6	4.8

CTA.CE: lot P3

Negative Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.069	0.069	0.068	0.069
Std.Deviation	0.007	0.008	0.008	0.008
CV %	10.7	11.0	11.6	11.1

Low Positive Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.800	0.792	0.789	0.793
Std.Deviation	0.040	0.039	0.038	0.039
CV %	5.0	4.9	4.8	4.9

High Positive Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.601	2.594	2.616	2.603
Std.Deviation	0.118	0.115	0.120	0.118
CV %	4.5	4.4	4.6	4.5

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

4. Accuracy

The assay accuracy has been checked by the dilution test. Any "hook effect", underestimation likely to happen at high doses of analyte, was ruled out

Important note:

The performance data have been obtained proceeding as the reading step described in the section M, point 12

S. LIMITATIONS

Bacterial contamination or heat inactivation of the specimen may affect the absorbance values of the samples with consequent alteration of the level of the analyte. Frozen samples containing fibrin particles or aggregates after thawing may generate some false results. This test is suitable only for testing single samples and not pooled ones. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. The patient's clinical history,

symptomatology, as well as other diagnostic data should be considered.

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

T. REFERENCES

- Bas S, Genevay S, Schenkel MC, Vischer TL. Importance of species-specific antigens in the serodiagnosis of Chlamydia trachomatis reactive arthritis. *Rheumatology* (Oxford). 2002 Sep;41(9):1017-20. PMID: 12209035 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Marston EL, James AV, Parker JT, Hart JC, Brown TM, Messmer TO, Jue DL, Black CM, Carlone GM, Ades EW, Sampson J. Newly characterized species-specific immunogenic Chlamydia pneumoniae peptide reactive with murine monoclonal and human serum antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Mar;9(2):446-52. PMID: 11874892 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Morré SA, Munk C, Persson K, Krüger-Kjaer S, van Dijk R, Meijer CJ, van Den Brule AJ. Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of Chlamydia trachomatis antibodies. *J Clin Microbiol*. 2002 Feb;40(2):584-7. PMID: 11825974 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Bas S, Muzzin P, Vischer TL. Chlamydia trachomatis serology: diagnostic value of outer membrane protein 2 compared with that of other antigens. *J Clin Microbiol*. 2001 Nov;39(11):4082-5. PMID: 11682533 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Bas S, Muzzin P, Ninet B, Bornand JE, Scieux C, Vischer TL. Chlamydial serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. *J Clin Microbiol*. 2001 Apr;39(4):1368-77. PMID: 11283058 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Klein M, Kötz A, Bernardo K, Krönke M. Detection of Chlamydia pneumoniae-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the major outer membrane protein. *J Clin Microbiol*. 2003 May;41(5):1957-62. PMID: 12734234 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S. Detection of Chlamydia trachomatis-specific antibodies in human sera by recombinant major outer-membrane protein polyantigens. *J Med Microbiol*. 2000 May;49(5):457-65. PMID: 10798559 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Jones CS, Maple PA, Andrews NJ, Paul ID, Caul EO. Measurement of IgG antibodies to Chlamydia trachomatis by commercial enzyme immunoassays and immunofluorescence in sera from pregnant women and patients with infertility, pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy, and laboratory diagnosed Chlamydia psittaci/Chlamydia pneumoniae infection. *J Clin Pathol*. 2003 Mar;56(3):225-9. PMID: 12610104 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Portig I, Goodall JC, Bailey RL, Gaston JS. Characterization of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2 in chlamydial infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Jan;10(1):103-7. PMID: 12522047 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Bas S, Vischer TL. Chlamydia trachomatis antibody detection and diagnosis of reactive arthritis. *Br J Rheumatol*. 1998 Oct;37(10):1054-9. PMID: 9825743 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S. Analysis of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998 May;5(3):313-8. PMID: 9605983 [PubMed - indexed for MEDLINE]

12. Bas S, Scieux C, Vischer TL. Different humoral immune response to Chlamydia trachomatis major outer membrane protein variable domains I and IV in Chlamydia-infected patients with or without reactive arthritis. Arthritis Rheum. 1999 May;42(5):942-7. PMID: 10323449 [PubMed - indexed for MEDLINE]
13. Neuer A, Lam KN, Tiller FW, Kiesel L, Witkin SS. Humoral immune response to membrane components of Chlamydia trachomatis and expression of human 60 kDa heat shock protein in follicular fluid of in-vitro fertilization patients. Hum Reprod. 1997 May;12(5):925-9. PMID: 9194641 [PubMed - indexed for MEDLINE]. 

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

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



0318

Chlamydia trachomatis IgA

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para
la determinación cualitativa
de anticuerpos IgA anti
Chlamydia Trachomatis
en suero y plasma humanos**

- Uso exclusivo para diagnóstico “in vitro”-



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

Chlamydia Trachomatis IgA

A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa de anticuerpos IgA anti Chlamydia Trachomatis en plasma y suero humanos. El producto se ha diseñado para el seguimiento de pacientes con patologías relacionadas con la infección por C. Trachomatis.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN

Chlamydia Trachomatis es un organismo intracelular obligado de tipo bacteriano que cuenta al menos con 15 serotipos reconocidos. C. Trachomatis es una de las tres especies distintas del género Chlamydia (trachomatis, psittaci y pneumoniae).

La infección por C. Trachomatis en adultos es responsable de la mayoría de uretritis de transmisión sexual en hombres, cervicitis mucopurulenta en mujeres, enfermedad inflamatoria pélvica, linfogranuloma venéreo, la mayoría de síndromes uretrales agudos, infecciones oculares, coloproctitis y epididimitis. En bebés, el organismo es responsable de neumonía y conjuntivitis.

Las infecciones debidas a C. Trachomatis estimulan que el paciente genere una fuerte respuesta inmunológica tanto en IgG, muy duradera, como en IgA e IgM, cuya presencia guarda más correlación con una infección en curso o un episodio reciente.

La determinación de IgG, IgM e IgA específicas de la especie es una herramienta útil para que el clínico identifique el agente infeccioso y para decidir la terapia adecuada.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

Las microplacas están recubiertas con un polipéptido específico de la especie derivado del antígeno principal de la membrana externa de C. Trachomatis.

En la 1ª incubación, la fase sólida se trata con muestras diluidas y las IgA anti-C. Trachomatis son capturadas, si las hay, por los antígenos.

Después del lavado, que elimina el resto de los componentes de la muestra, en la 2ª incubación se detectan las IgA anti-C. Trachomatis unidas, por la adición de anticuerpo anti hIgA, marcado con peroxidasa (HRP).

El enzima capturado en la fase sólida, combinado con la mezcla sustrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgA anti-C. Trachomatis presentes en la muestra.

La presencia de IgA en la muestra se determina entonces por medio de un valor de corte capaz de discriminar entre la población negativa y la positiva.

Las interferencias debidas a IgG se bloquean por medio de un reactivo neutralizante añadido directamente a la muestra en el pocillo.

D. COMPONENTES

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplacas: MICROPLATE

12 tiras de 8 pocillos recubiertos con un antígeno sintético inmunodominante específico de CT en presencia de proteínas de bovino. Las placas se encuentran en una bolsa sellada con desecante.

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

2. Control negativo: CONTROL -

1x4.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene suero humano negativo para anticuerpos IgA anti C. Trachomatis, 2% de caseína, tampón de citrato sódico 10 mM a pH 6.0 +/- 0.1, 0.1% de Tween 20, además de azida sódica al 0.09% y ProClin 300 al 0.045% como conservantes.

El control negativo está codificado con el color amarillo.

3. Control positivo: CONTROL +

1x4.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene alto título de anticuerpos IgM humanos positivos para IgA anti C. Trachomatis, 2% de caseína, tampón de citrato sódico 10 mM a pH 6.0 +/- 0.1, 0.1% de Tween 20, además de azida sódica al 0.09% y ProClin 300 al 0.045% como conservantes.

El control positivo está codificado con el color verde.

4. Solución de lavado concentrada: WASHBUF 20X

1x60ml/botella, solución concentrada 20x.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% de Tween 20 y ProClin 300 al 0.045%.

5. Conjugado de enzima: CONJ

1x16ml/vial. Listo para el uso y codificado con color rojo. Contiene anticuerpos policlonales de cabra anti IgA humana conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP), 5% de albúmina de suero bovino (BSA), tampón Tris 10 mM a pH 6.8 +/- 0.1, y ProClin 300 al 0.045% y sulfato de gentamicina al 0.02% como conservantes.

6. Cromógeno/ Substrato: SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 3.5-3.8, dimetilsulfóxido 4%, tetrametil benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02%.

Nota: Conservar protegido de la luz, la sustancia es sensible a la iluminación fuerte.

7. Ácido Sulfúrico: H₂SO₄ 0.3 M

1x15 ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0.3 M.

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

8. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60 ml/vial. Contiene 2% de caseína, tampón citrato sódico 10mM a pH 6.0 +/- 0.1, 0.1% de Tween 20, además azida sódica al 0.09% y ProClin 300 al 0.045% como conservantes. Utilizar para diluir la muestra.

9. Reactivo neutralizante: SOLN NEUT

1x8 ml/vial. Contiene anti hIgG de cabra, 2% de caseína, tampón citrato sódico 10 mM a pH 6.0 +/- 0.1, azida sódica al 0.09% y ProClin 300 al 0.045% como conservantes.

10. Sellador adhesivo n.º 2

11. Hoja de instrucciones n.º 1

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (1000, 100 y 10 µl) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para eliminar oxidantes químicos usados como desinfectantes).
3. Temporizador con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) ajustado a +37°C (+/- 0.5°C de tolerancia).
6. Lector calibrado de micropocillos de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y filtros de 620-630 nm (blanco).
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Agitador Vortex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo debe ser usado exclusivamente por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de realizar las pruebas deben llevar los indumentos protectores adecuados de laboratorio, guantes sin talco y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). Todo el personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación con polvo o agentes microbianos ambientales cuando se abran los viales y las microplacas del equipo, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno (TMB) a la luz fuerte y evitar las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar componentes de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos del mismo lote.
7. Comprobar que los reactivos sean transparentes y no contengan precipitados ni agregados visibles. De darse el caso, informar al responsable del laboratorio para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el equipo después de la fecha de caducidad indicada en el contenedor externo y en las etiquetas internas (viales). Según un estudio realizado sobre un equipo abierto, no se ha detectado pérdida relevante de actividad, en hasta seis usos por un período de hasta 3 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Todas las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de los componentes líquidos y para la transferencia de los componentes a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones cruzadas.
13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas y las leyes nacionales relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos procedentes del procedimiento de lavado, de restos de controles y muestras deben ser tratados como material potencialmente infeccioso e inactivarse antes de su eliminación. Se recomienda la inactivación con una concentración final de lejía al 10% durante 16-18 horas o la inactivación con calor mediante autoclave a 121 °C durante 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto o muestra, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.

16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas utilizadas para las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas y leyes nacionales para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y ADVERTENCIAS.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar para la preparación de muestras en los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante códigos o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Se recomienda el uso de código de barras y lectura electrónica.
3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o visiblemente hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos y cuerpos microbianos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si hay presencia de partículas, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0.2-0.8µ.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y ADVERTENCIAS.

Microplacas:

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

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

Las tiras de pocillos no utilizadas deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Cuando se abren por primera vez, las tiras sobrantes se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa con desecante cambia de amarillo a verde.

Controles negativo y positivo

Componente listo para usar. Mezclar cuidadosamente en el agitador Vortex antes de usar.

Solución de lavado concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada y mezclarse delicadamente antes de usarse. Durante la preparación hay que evitar la formación de espuma y burbujas, que podrían reducir la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución de lavado es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8° C.

Conjugado de enzima:

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

Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios ambientales.

En caso de que deba transferirse este componente, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Cromógeno/ Substrato:

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

Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios ambientales.

Evitar la exposición a la iluminación fuerte, agentes oxidantes y superficies metálicas.

En caso de que deba transferirse este componente, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Diluyente de muestras

Componente listo para usar. Mezclar cuidadosamente en el agitador Vortex antes de usar.

Reactivo neutralizante

Reactivo listo para usar. Mezclar cuidadosamente en el agitador Vortex antes de usar.

Ácido Sulfúrico:

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

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

Leyenda:

Indicación de peligro, Frases H

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, Frases P

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

1. Las micropipetas deben estar calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol al 70%, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Deben además ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%. Deben descontaminarse periódicamente los residuos o derrames de los componentes del equipo.
2. La incubadora ELISA debe ser ajustada a +37°C (+/- 0.5° C de tolerancia) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado

diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.

4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de $\pm 5\%$.
5. El lector de microplaca ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro (620-630 nm, obligatorio) para reducir interferencias en la lectura. El rendimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda $\leq 10\text{nm}$ b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2.0 , c) Linealidad ≥ 2.0 , reproducibilidad $\geq 1\%$. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente debe procederse al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
6. En caso de usar un sistema automatizado ELISA, todos los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de contaminación de pocillos adyacentes. Se recomienda el uso de sistemas automatizados de Elisa cuando la cantidad de muestras a controlar supera las 20-30 unidades por serie.
7. El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para ajustar y comprobar los instrumentos a usar en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos. También se ofrece apoyo para la instalación de nuevos instrumentos a usar con el equipo.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los componentes líquidos no están contaminados con partículas ni agregados visibles.
3. Comprobar que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen con una pipeta estéril de plástico.
4. Comprobar que no han ocurrido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Comprobar que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no está perforada ni dañada.
5. Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
6. Dejar que los componentes restantes alcancen la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el agitador Vortex todos los reactivos líquidos.
7. Ajustar la incubadora de ELISA a +37°C y alimentar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número correcto de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
8. Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
9. Si se utiliza un sistema automatizado, encenderlo, comprobar la configuración y asegurarse de utilizar el protocolo de ensayo adecuado.

- Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
- Asegurarse de que el equipamiento restante esté disponible y listo para el uso.
- En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación. Es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

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

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

- Dispensar 100 µl de control negativo por triplicado y de control positivo por duplicado. A continuación, dispensar 100 µl de muestras diluidas en cada pocillo adecuadamente identificado.
- Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C**.

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

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

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

- Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C**.
- Lavar los micropocillos como en el paso 6.
- Dispensar 100 µl de la mezcla Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1. Incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se puede generar un fondo excesivo.

- Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos, usando la misma secuencia que en el paso 10. La adición del ácido cambia el color de los calibradores positivos, del suero de control y de las muestras positivas de azul a amarillo.
- Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del

fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

Notas generales importantes:

- Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo del micropocillo antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
- La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de stop y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO.

Método	Operaciones
Reactivo neutralizante (sólo para muestras)	50 µl
Controles	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado de enzima	100 µl
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37 °C
Paso de lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
TMB/H2O2	100 µl
3ª incubación	20 min
Temperatura	t.a.
Ácido Sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450nm/620-630nm

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado para análisis cualitativo:

Microplaca												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M 3										
B	CN	M 4										
C	CN	M 5										
D	CN	M 6										
E	CP	M 7										
F	CP	M 8										
G	M 1	M 9										
H	M 2	M 10										

Legenda: BL = Blanco CN = Control Negativo
CP = Control positivo M = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza una comprobación para validar los controles siempre que se utiliza el equipo para verificar si el rendimiento del ensayo reúne las condiciones.

Controlar que los datos siguientes coinciden:

Compruebe que:	Exigencia
Pocillo blanco	Valor < 0.100 DO450nm
Control negativo	Valor medio < 0.150 de DO450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación < 30%
Control Positivo	DO450nm > 0.750 valor medio de DO450nm después de leer el blanco

Si los resultados del ensayo coinciden con la exigencia indicada arriba, pase a la siguiente sección.

En caso contrario, no continuar y hacer lo siguiente:

Problema	Compruebe que:
Pocillo blanco ≥ 0.100 DO450nm	1. la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
Control negativo > 0.150 DO450nm después de leer el blanco coeficiente de variación > 30%	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido alimentado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento de ensayo (dispensar el calibrador positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del calibrador negativo ni de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado de enzima. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas ni con el conjugado de enzima. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
Control Positivo < 0.750 DO450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en la distribución (dispensar un calibrador equivocado en su lugar). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

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

Nota importante:

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

P. RESULTADOS

Si la prueba es válida, los resultados se calculan a partir del valor medio de DO450nm/620-630nm del control negativo (CN), mediante un valor de corte (Co) determinado con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de corte} = \text{CN} + 0.250$$

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

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

La interpretación de los resultados de la prueba se realiza mediante la relación entre el valor de DO450nm/620-630nm de la muestra (M) y el valor de corte (Co), o M/Co. Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

M/Co	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9 < M/Co < 1.0	Equívoco
≥ 1.0	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no ha desarrollado anticuerpos IgA anti Chlamydia Trachomatis.

Los pacientes cuya muestra resulte no concluyente deben someterse a una nueva prueba con una segunda muestra tomada 1 o 2 semanas después de la inicial.

Un resultado positivo es indicativo de una infección en curso por C. Trachomatis y, por lo tanto, el paciente debe ser tratado en consecuencia.

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
3. El diagnóstico debe ser realizado y comunicado al paciente por un médico calificado.

A continuación se describe un ejemplo de los cálculos a realizar (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 12).

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

Control negativo: 0.080 – 0.120 – 0.080 DO450nm
 Valor medio: 0.100 DO450nm
 Menor de 0.150 – Válido
 Control positivo: 1.000 DO450nm
 Mayor de 0.750 – Válido
 Valor de corte = 0.100 + 0.250 = 0.350

Muestra 1: 0.080 DO450nm
 Muestra 2: 1.800 DO450nm
 Muestra 1 M/Co < 0.9 = negativa
 Muestra 2 M/Co > 1.0 = positiva

R. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

La evaluación del rendimiento ha sido realizada en paneles de muestras positivas y negativas con respecto a un equipo de referencia con marca CE.

1. Límite de detección.

Ningún estándar internacional para la detección de anticuerpos IgA anti C. Trachomatis ha sido definido hasta el momento por la Comunidad Europea.

A falta de dicho estándar, con el objetivo de garantizar una excelente y constante sensibilidad del dispositivo, fue definido un estándar de oro interno (IGS), a partir de un paciente con un historial de infección por C. Trachomatis.

2. Sensibilidad y especificidad diagnóstica:

La evaluación del rendimiento diagnóstico se realizó con muestras suministradas por dos centros externos con gran experiencia en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

La **sensibilidad** del diagnóstico se estudió en más de 50 muestras positivas con el equipo de referencia. Las muestras positivas se recogieron de pacientes con un historial clínico de infección por Chlamydia Trachomatis.

La **especificidad** diagnóstica se determinó utilizando paneles de más de 100 muestras, provenientes de individuos sanos y donantes de sangre, clasificadas como negativas mediante un equipo de referencia, incluyendo muestras con interferencias potenciales.

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

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

Se hicieron ensayos con muestras que potencialmente podían interferir (de embarazadas, hemolizadas, lipémicas, RF+).

No se han observado reacciones cruzadas.

Se obtuvieron los siguientes valores a partir de la evaluación del rendimiento:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

3. Precisión:

Se ha calculado con tres muestras, una negativa, una débilmente positiva y una altamente positiva, examinadas en 16 réplicas en tres series separadas de tres lotes.

Los resultados se describen del modo siguiente:

CTA.CE: lote P1

Muestra negativa (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO450nm	0.051	0.051	0.053	0.051
Desviación estándar	0.0058	0.0065	0.0075	0.0066
CV %	11	13	14	12.6

Muestra débilmente positiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO450nm	0.767	0.766	0.788	0.773
Desviación estándar	0.037	0.039	0.039	0.038
CV %	4.8	5.1	4.9	4.9

Muestra altamente positiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO450nm	2.570	2.539	2.541	2.550
Desviación estándar	0.086	0.092	0.086	0.088
CV %	3.3	3.6	3.4	3.4

CTA.CE: lote P2

Muestra negativa (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO450nm	0.065	0.063	0.065	0.064
Desviación estándar	0.007	0.007	0.007	0.007
CV %	10.4	11.2	11.4	11

Muestra débilmente positiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO450nm	0.808	0.820	0.817	0.815
Desviación estándar	0.042	0.044	0.043	0.043
CV %	5.2	5.4	5.3	5.3

Muestra altamente positiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO450nm	2.604	2.584	2.597	2.595
Desviación estándar	0.124	0.128	0.119	0.124
CV %	4.8	4.9	4.6	4.8

CTA.CE: lote P3

Muestra negativa (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO450nm	0.069	0.069	0.068	0.069
Desviación estándar	0.007	0.008	0.008	0.008
CV %	10.7	11.0	11.6	11.1

Muestra débilmente positiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO450nm	0.800	0.792	0.789	0.793
Desviación estándar	0.040	0.039	0.038	0.039
CV %	5.0	4.9	4.8	4.9

Muestra altamente positiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO450nm	2.601	2.594	2.616	2.603
Desviación estándar	0.118	0.115	0.120	0.118
CV %	4.5	4.4	4.6	4.5

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

4. Precisión

La precisión del ensayo se ha comprobado con la prueba de dilución. Se descartó cualquier "efecto gancho" (subestimación que probablemente ocurriría con dosis altas de analito)

Nota importante:

Los datos de rendimiento se obtuvieron siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 12.

S. LIMITACIONES

La contaminación bacteriana o la inactivación con calor de la muestra pueden afectar los valores de absorbancia de las muestras con la consecuente alteración de nivel del analito. Las muestras que tras ser descongeladas presentan partículas de fibrina o agregados pueden generar algunos resultados falsos.

El ensayo es útil sólo para probar muestras independientes y no mezclas.

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no debe establecerse en base a un solo resultado, sino que deben tenerse en consideración la historia clínica del paciente, la sintomatología, así como otros datos diagnósticos.

Se ha evaluado falso positivo en menos del 2% de la población normal.

T. BIBLIOGRAFÍA

- Bas S, Genevay S, Schenkel MC, Vischer TL. Importance of species-specific antigens in the serodiagnosis of Chlamydia trachomatis reactive arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2002 Sep;41(9):1017-20. PMID: 12209035 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Marston EL, James AV, Parker JT, Hart JC, Brown TM, Messmer TO, Jue DL, Black CM, Carlone GM, Ades EW, Sampson J. Newly characterized species-specific immunogenic Chlamydia pneumoniae peptide reactive

- with murine monoclonal and human serum antibodies. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 Mar;9(2):446-52.PMID: 11874892 [PubMed - indexed for MEDLINE]
3. Morré SA, Munk C, Persson K, Krüger-Kjaer S, van Dijk R, Meijer CJ, van Den Brule AJ. Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of Chlamydia trachomatis antibodies. J Clin Microbiol. 2002 Feb;40(2):584-7.PMID: 11825974 [PubMed - indexed for MEDLINE]
 4. Bas S, Muzzin P, Vischer TL. Chlamydia trachomatis serology: diagnostic value of outer membrane protein 2 compared with that of other antigens. J Clin Microbiol. 2001 Nov;39(11):4082-5.PMID: 11682533 [PubMed - indexed for MEDLINE]
 5. Bas S, Muzzin P, Ninet B, Bornand JE, Scieux C, Vischer TL. Chlamydial serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. J Clin Microbiol. 2001 Apr;39(4):1368-77. PMID: 11283058 [PubMed - indexed for MEDLINE]
 6. Klein M, Kötz A, Bernardo K, Krönke M. Detection of Chlamydia pneumoniae-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the major outer membrane protein. J Clin Microbiol. 2003 May;41(5):1957-62.PMID: 12734234 [PubMed - indexed for MEDLINE]
 7. Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S. Detection of Chlamydia trachomatis-specific antibodies in human sera by recombinant major outer-membrane protein polyanitens. J Med Microbiol. 2000 May;49(5):457-65. PMID: 10798559 [PubMed - indexed for MEDLINE]
 8. Jones CS, Maple PA, Andrews NJ, Paul ID, Caul EO. Measurement of IgG antibodies to Chlamydia trachomatis by commercial enzyme immunoassays and immunofluorescence in sera from pregnant women and patients with infertility, pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy, and laboratory diagnosed Chlamydia psittaci/Chlamydia pneumoniae infection. J Clin Pathol. 2003 Mar;56(3):225-9.PMID: 12610104 [PubMed - indexed for MEDLINE]
 9. Portig I, Goodall JC, Bailey RL, Gaston JS. Characterization of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2 in chlamydial infection. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jan;10(1):103-7.PMID: 12522047 [PubMed - indexed for MEDLINE]
 10. Bas S, Vischer TL. Chlamydia trachomatis antibody detection and diagnosis of reactive arthritis. Br J Rheumatol. 1998 Oct;37(10):1054-9.PMID: 9825743 [PubMed - indexed for MEDLINE]
 11. Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S. Analysis of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2. Clin Diagn Lab Immunol. 1998 May;5(3):313-8.PMID: 9605983 [PubMed - indexed for MEDLINE]
 12. Bas S, Scieux C, Vischer TL. Different humoral immune response to Chlamydia trachomatis major outer membrane protein variable domains I and IV in Chlamydia-infected patients with or without reactive arthritis. Arthritis Rheum. 1999 May;42(5):942-7.PMID: 10323449 [PubMed - indexed for MEDLINE]
 13. Neuer A, Lam KN, Tiller FW, Kiesel L, Witkin SS. Humoral immune response to membrane components of Chlamydia trachomatis and expression of human 60 kDa heat shock protein in follicular fluid of in-vitro fertilization patients. Hum Reprod. 1997 May;12(5):925-9.PMID: 9194641 [PubMed - indexed for MEDLINE]. 

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el marcado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

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

CE
0318

Chlamydia trachomatis IgG

**Enzyme Immunoassay (ELISA) for the
quantitative determination of IgG antibodies
specific to Chlamydia trachomatis
in human serum and plasma**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

C.trachomatis IgG

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the quantitative determination of IgG antibodies specific to Chlamydia trachomatis in human plasma and sera.

The kit is intended for the follow up of patients undergoing a Chlamydia trachomatis infection.

For in vitro diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

Chlamydia trachomatis is a bacterium-like obligate intracellular organism that counts at least 15 recognized serotypes. C.trachomatis is one of the three distinct species within the genus Chlamydia (trachomatis, psittaci and pneumoniae).

C.trachomatis infection in adults is responsible of most of sexually acquired urethritis in men, mucopurulent cervicitis in women, pelvic inflammatory disease, lymphogranuloma venereum, most of acute urethral syndromes, ocular infections, proctocolitis and epididymitis. In infants, the organism is responsible of pneumonia and conjunctivitis.

Infections due to C.trachomatis stimulates the patient to generate a strong immunological response both in IgG, lasting a long time, and IgA, whose presence is more correlated with an ongoing infection or a recent event.

The determination of species-specific IgG, IgA and IgM is a helpful tool for the clinician to identify the infective agent and to decide the right therapy.

C. PRINCIPLE OF THE ASSAY

Microplates are coated with an immunodominant species-specific polypeptide derived from Chlamydia trachomatis major outer-membrane antigen (MOMP), that makes the assay very specific for C.trachomatis (no cross reaction with C.pneumoniae).

In the 1st incubation, the solid phase is treated with diluted samples and anti-C.trachomatis IgG are captured, if present, by the solid phase.

After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti-C.trachomatis IgG are detected by the addition of anti hlgG antibody, labelled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti-C.trachomatis IgG antibodies present in the sample. IgG in the sample may be quantitated by means of a standard curve calibrated in arbitrary units per milliliter (Uarb/ml) as no international standard is available.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 breakable wells coated with purified C.trachomatis polypeptide *in presence of bovine proteins*. Plates are sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

2. Calibration Curve: CAL N° ...

Ready to use and color coded standard curve derived from human plasma positive for Chlamydia Trachomatis IgG and titrated on an Internal Gold Standard ranging :

4ml CAL1 = 0 arbU/ml

4ml CAL2 = 5 arbU/ml

2ml CAL3 = 10 arbU/ml

2ml CAL4 = 20 arbU/ml

2ml CAL 5 = 50 arbU/ml

4ml CAL6 = 100 arbU/ml.

Standards are calibrated against an internal Gold Standard or IGS as no international one is defined.

Contains human serum proteins, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. Standards are blue color coded.

3. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle20x concentrated solution. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

5. Enzyme conjugate: CONJ

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

6. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

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

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

7. Sulphuric Acid: H2SO4 0.3 M

1x15ml/vialIt contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

8. Specimen Diluent: DILSPE

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

Blue color coded.

9. Plate sealing foils n°2

10. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

Doc.:	INS CTG.CE/Eng	Page	3 of 8	Rev.:	3	Date:	2020/03
-------	----------------	------	--------	-------	---	-------	---------

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

3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.

4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-borne microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.

5. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.

6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.

7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.

8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.

9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.

10. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit did not pointed out any relevant loss of activity up to six uses of the device and up to 3 months.

11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

12. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.

13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..

14. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.

15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water

16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.

2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.

3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.

5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of manufacturing.

In this case call Dia.Pro's customer service.

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

Calibration Curve

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

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

Sample Diluent

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

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/-0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).
5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.
An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of ±5%.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter (620-630nm, mandatory) for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0; (c) linearity to ≥ 2.0; repeatability ≥ 1%. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system

of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.

7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
6. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
7. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
8. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
9. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
10. Check that the micropipettes are set to the required volume.
11. Check that all the other equipment is available and ready to use.
12. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

The kit may be used for quantitative and qualitative determinations as well.

M1. QUANTITATIVE DETERMINATION:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the A1 and B1 empty for the operation of blanking.
3. Then dispense 100 µl of Calibrators in duplicate. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
4. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- Wash the microplate with an automatic washer reported previously (section I.3).
- Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except A1+B1 blanking wells, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1 and B1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
- Wash microwells as in step 5.
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank wells A1 and B1 included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µl Sulphuric Acid to stop the enzymatic reaction into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1 or B1 or both.

M2. QUALITATIVE DETERMINATION

If only a qualitative determination is required, proceed as described below:

- Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
- Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.
- Dispense 100 µl of Calibrator 0 arbU/ml and Calibrator 5 arbU/ml in duplicate and Calibrator 100 arbU/ml in single. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section I.3).
- Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the A1 well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

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

- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

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

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Calibrators	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H2O2	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm/620-630nm

An example of dispensation scheme for Quantitative Analysis is reported below:

Microplate												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S3									
B	BLK	CAL4	S4									
C	CAL1	CAL5	S5									
D	CAL1	CAL5	S6									
E	CAL2	CAL6	S7									
F	CAL2	CAL6	S8									
G	CAL3	S1	S9									
H	CAL3	S2	S10									

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrator
CS = Control Serum S = Sample

An example of dispensation scheme in qualitative assays is reported below:

Microplate												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 3	S11									
B	CAL1	S 4	S12									
C	CAL1	S 5	S13									
D	CAL2	S 6	S14									
E	CAL2	S 7	S15									
F	CAL6	S 8	S16									
G	S1	S 9	S17									
H	S2	S10	S18									

Legenda: BLK = Blank
S = Sample
CAL = Calibrators

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the calibrators any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as qualified.

Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.150 OD450nm value
CAL 1 0 arbU/ml	< 0.200 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
CAL 2 5 arbU/ml	OD450nm > OD450nm CAL1 + 0.100
CAL 6 100 arbU/ml	OD450nm > 1.000

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

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

Problem	Check
Blank Well > 0.150	1. that the Chromogen/Sustrate solution has not got contaminated during the assay
CAL 1 0 arbU/ml > 0.200 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive calibrator instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative calibrator or of their wells has occurred due spills of positive samples or the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
CAL 2 5 arbU/ml OD450nm < OD450nm CAL1 + 0.100	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (ex.: dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
CAL 6 100 arbU/ml < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead);

3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study;
4. that no external contamination of the positive control has occurred.

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

Important note:

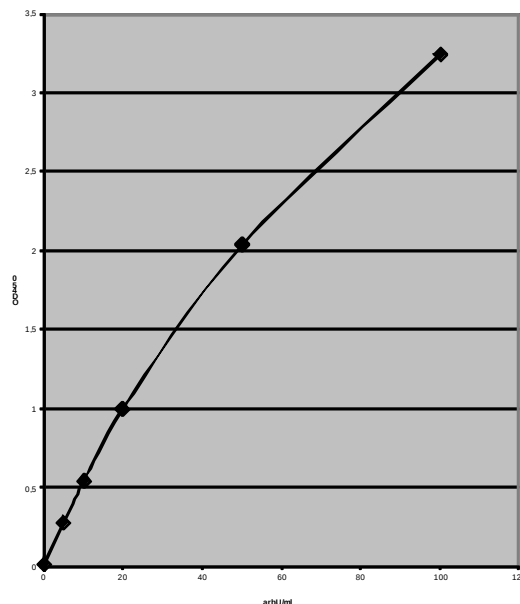
The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 11.

P. RESULTS

P.1 Quantitative method

If the test turns out to be valid, use for the quantitative method an approved curve fitting program to draw the calibration curve from the values obtained by reading at 450nm/620-630nm (4-parameters interpolation is suggested). Then on the calibration curve calculate the concentration of anti C.trachomatis IgG antibody in samples.

An example of Calibration curve is reported below.



Important Note:

Do not use the calibration curve above to make calculations.

P.2 Qualitative method

In the qualitative method, calculate the mean OD450nm/620-630nm values for the Calibrators 0 and 5 arbU/ml and then check that the assay is valid.

Example of calculation (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 11):

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

Calibrator 0 arbU/ml: 0.020 – 0.024 OD450nm
Mean Value: 0.022 OD450nm
Lower than 0.150 – Accepted
Calibrator 5 arbU/ml: 0.250 – 0.270 OD450nm
Mean Value: 0.260 OD450nm
Higher than Cal 0 + 0.100 – Accepted

Calibrator 100 arbU/ml: 2.045 OD450nm
Higher than 1.000 – Accepted

The OD450nm/620-630nm of the Calibrator 5 arbU/ml is considered the cut-off (or Co) of the system.

The ratio between the OD450nm/620-630nm value of the sample and the OD450nm/620-630nm of the Calibrator 5 arbU/ml (or S/Co) can provide a semi-quantitative estimation of the content of specific anti C.trachomatis in the sample.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Samples with a concentration lower than 5 arbU/ml are considered negative for anti C.trachomatis IgG antibody. Samples with a concentration higher than 5 arbU/ml are considered positive for anti C.trachomatis IgG antibody.

Important notes:

1. Results of this test alone are not enough to provide a clear diagnosis of Chlamydia trachomatis infection. Other diagnostic tests (example PCR) should be carried out.
2. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
3. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
4. Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted on panels of positive and negative samples with reference to a CE marked reference kit.

1. Limit of detection

No international standard for C.trachomatis IgG antibody detection has been defined so far by the European Community.

In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient with an history of past infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The diagnostic performances were evaluated on samples supplied by an external center, with excellent experience in the diagnosis of infectious diseases.

The diagnostic **sensitivity** was studied on more than 100 samples, positive with the reference kit. Positive samples were collected from patients with a clinical history of Chlamydia trachomatis infection.

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

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

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

The Performance Evaluation provided the following values :

Sensitivity	> 98 %
Specificity	> 98 %

3. Precision:

It has been calculated on three samples, a negative, a low positive and a high positive, examined in 16 replicates in three separate runs for three lots.

Results are reported as follows:

CTG.CE: lot P1

Calibrator 0 ArbU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.075	0.080	0.078	0.078
Std.Deviation	0.005	0.007	0.007	0.006
CV %	7.1	8.7	8.8	8.2

Calibrator 5 ArbU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.306	0.260	0.269	0.281
Std.Deviation	0.025	0.031	0.043	0.033
CV %	8.1	8.3	6.2	7.5

Calibrator 50 ArbU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	1.760	1.508	1.692	1.653
Std.Deviation	0.086	0.061	0.066	0.07
CV %	4.9	4.1	3.9	4.3

CTG.CE: lot P2

Calibrator 0 ArbU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.079	0.077	0.078	0.078
Std.Deviation	0.006	0.005	0.006	0.006
CV %	7.4	7.1	7.7	7.4

Calibrator 5 ArbU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.271	0.265	0.266	0.267
Std.Deviation	0.019	0.019	0.019	0.019
CV %	7.1	7.3	7.0	7.2

Calibrator 50 ArbU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	1.638	1.651	1.647	1.645
Std.Deviation	0.059	0.053	0.058	0.057
CV %	3.6	3.2	3.5	3.4

CTG.CE: lot P3

Calibrator 0 ArbU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.078	0.080	0.078	0.079
Std.Deviation	0.005	0.006	0.006	0.006
CV %	7.0	7.5	7.2	7.2

Calibrator 5 ArbU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.269	0.276	0.271	0.272
Std.Deviation	0.020	0.019	0.020	0.020
CV %	7.3	6.9	7.4	7.2

Calibrator 50 ArbU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	1.578	1.595	1.608	1.594
Std.Deviation	0.053	0.049	0.054	0.052
CV %	3.3	3.1	3.4	3.3

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

4. Accuracy

The assay accuracy has been checked by the dilution and recovery tests. Any "hook effect", underestimation likely to happen at high doses of analyte, was ruled out.

Important note:

The performance data have been obtained proceeding as the reading step described in the section M, point 11.

S. LIMITATIONS

Bacterial contamination or heat inactivation of the specimen may affect the absorbance values of the samples with consequent alteration of the level of the analyte.

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates after thawing may generate some false results.

This test is suitable only for testing single samples and not pooled ones.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. The patient's clinical history, symptomatology, as well as other diagnostic data should be considered.

T. REFERENCES

- Bas S, Genevay S, Schenkel MC, Vischer TL. Importance of species-specific antigens in the serodiagnosis of Chlamydia trachomatis reactive arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2002 Sep;41(9):1017-20. PMID: 12209035 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Marston EL, James AV, Parker JT, Hart JC, Brown TM, Messmer TO, Jue DL, Black CM, Carlone GM, Ades EW, Sampson J. Newly characterized species-specific immunogenic Chlamydia pneumoniae peptide reactive with murine monoclonal and human serum antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Mar;9(2):446-52. PMID: 11874892 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Morré SA, Munk C, Persson K, Krüger-Kjaer S, van Dijk R, Meijer CJ, van Den Brule AJ. Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of Chlamydia trachomatis antibodies. *J Clin Microbiol*. 2002 Feb;40(2):584-7. PMID: 11825974 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Bas S, Muzzin P, Vischer TL. Chlamydia trachomatis serology: diagnostic value of outer membrane protein 2 compared with that of other antigens. *J Clin Microbiol*. 2001 Nov;39(11):4082-5. PMID: 11682533 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Bas S, Muzzin P, Ninet B, Bornand JE, Scieux C, Vischer TL. Chlamydial serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. *J Clin Microbiol*. 2001 Apr;39(4):1368-77. PMID: 11283058 [PubMed - indexed for MEDLINE]

- Klein M, Kötz A, Bernardo K, Krönke M. Detection of Chlamydia pneumoniae-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the major outer membrane protein. *J Clin Microbiol*. 2003 May;41(5):1957-62. PMID: 12734234 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S. Detection of Chlamydia trachomatis-specific antibodies in human sera by recombinant major outer-membrane protein polyantigens. *J Med Microbiol*. 2000 May;49(5):457-65. PMID: 10798559 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Jones CS, Maple PA, Andrews NJ, Paul ID, Caul EO. Measurement of IgG antibodies to Chlamydia trachomatis by commercial enzyme immunoassays and immunofluorescence in sera from pregnant women and patients with infertility, pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy, and laboratory diagnosed Chlamydia psittaci/Chlamydia pneumoniae infection. *J Clin Pathol*. 2003 Mar;56(3):225-9. PMID: 12610104 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Portig I, Goodall JC, Bailey RL, Gaston JS. Characterization of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2 in chlamydial infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Jan;10(1):103-7. PMID: 12522047 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Bas S, Vischer TL. Chlamydia trachomatis antibody detection and diagnosis of reactive arthritis. *Br J Rheumatol*. 1998 Oct;37(10):1054-9. PMID: 9825743 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S. Analysis of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998 May;5(3):313-8. PMID: 9605983 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Bas S, Scieux C, Vischer TL. Different humoral immune response to Chlamydia trachomatis major outer membrane protein variable domains I and IV in Chlamydia-infected patients with or without reactive arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999 May;42(5):942-7. PMID: 10323449 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Neuer A, Lam KN, Tiller FW, Kiesel L, Witkin SS. Humoral immune response to membrane components of Chlamydia trachomatis and expression of human 60 kDa heat shock protein in follicular fluid of in-vitro fertilization patients. *Hum Reprod*. 1997 May;12(5):925-9. PMID: 9194641 [PubMed - indexed for MEDLINE]

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:

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

CE
0318

Chlamydia trachomatis IgG

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la
determinación cuantitativa de anticuerpos IgG
específicos anti Chlamydia Trachomatis
en suero y plasma humanos**

- Uso exclusivo para diagnóstico “in vitro” -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

C. trachomatis IgG

C. OBJETIVO DEL EQUIPO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG específicos anti Chlamydia Trachomatis en plasma y suero humanos.

El equipo está diseñado para el seguimiento de pacientes que padecen una infección por Chlamydia Trachomatis.

Uso exclusivo para diagnóstico in vitro.

D. INTRODUCCIÓN

Chlamydia Trachomatis es un organismo intracelular obligado de tipo bacteriano que cuenta al menos con 15 serotipos reconocidos. C. Trachomatis es una de las tres especies distintas del género Chlamydia (Trachomatis, psittaci y pneumoniae).

La infección por C. Trachomatis en adultos es responsable de la mayoría de uretritis de transmisión sexual en hombres, cervicitis mucopurulenta en mujeres, enfermedad inflamatoria pélvica, linfogranuloma venéreo, la mayoría de síndromes uretrales agudos, infecciones oculares, coloproctitis y epididimitis. En bebés, el organismo es responsable de neumonía y conjuntivitis.

Las infecciones debidas a C. Trachomatis estimulan que el paciente genere una fuerte respuesta inmunológica tanto en IgG, muy duradera, como en IgA, cuya presencia guarda más correlación con una infección en curso o un episodio reciente. La determinación de IgG, IgA e IgM específicas de la especie es una herramienta útil para que el clínico identifique el agente infeccioso y para decidir la terapia adecuada.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

Las microplacas están recubiertas con un polipéptido específico de la especie derivado del antígeno principal de la membrana externa de Chlamydia Trachomatis (MOMP), lo que hace que el ensayo sea muy específico para C. Trachomatis (sin reacción cruzada con C. Pneumoniae).

En la 1ª incubación, la fase sólida se trata con muestras diluidas y las IgG anti-C. Trachomatis son capturadas, si las hay, por la fase sólida.

Después del lavado, que elimina el resto de los componentes de la muestra, en la 2ª incubación se detectan las IgG anti C. Trachomatis unidas, por la adición de anticuerpo anti hIgG, marcado con peroxidasa (HRP).

El enzima capturado en la fase sólida, combinado con la mezcla sustrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG anti C. Trachomatis presentes en la muestra. La presencia de IgG en la muestra puede cuantificarse por medio de una curva estándar calibrada en unidades arbitrarias por milímetro (Uarb/ml) porque no hay ningún estándar internacional disponible.

D. COMPONENTES

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplacas: MICROPLATE

12 tiras de 8 pocillos rompibles recubiertos con polipéptido purificado de C. Trachomatis en presencia de proteínas de bovino. Las placas se encuentran en una bolsa sellada con desecante. Dejar que la microplaca alcance la temperatura ambiente antes de abrirla, volver a sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y conservar a 4°C.

2. Curva de calibración: CAL N° ...

Curva estándar lista para el uso y con código de colores derivada de plasma humano positivo para IgG anti Chlamydia Trachomatis y titulada según un estándar de oro interno que oscila entre:

4 ml CAL1 = 0 arbU/ml

4 ml CAL2 = 5 arbU/ml

2ml CAL3 = 10 arbU/ml

2 ml CAL4 = 20 arbU/ml

2ml CAL 5 = 50 arbU/ml

4ml CAL6 = 100 arbU/ml.

Los estándares se calibran respecto a un estándar de oro interno o IGS ya que no se ha definido ninguno internacional.

Contiene proteínas de suero humano, 2% de caseína, tampón citrato sódico 10mM a pH 6.0 +/-0.1, 0.1% de Tween 20, además azida sódica al 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes. Los estándares están codificados con color azul.

3. Solución de lavado concentrada: WASHBUF 20X

1x60ml/botella, solución concentrada 20x. Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% de Tween 20 y ProClin 300 al 0,045%.

5. Conjugado de enzima: CONJ

1x16ml/vial. Listo para el uso y codificado con color rojo. Contiene anticuerpos policlonales de cabra anti IgG humana conjugados con peroxidasa (HRP), 5% de albúmina de suero bovino (BSA), tampón Tris 10 mM a pH 6,8+/-0.1, y ProClin 300 al 0,045% y sulfato de gentamicina al 0.02% como conservantes.

6. Cromógeno/ Substrato: SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 3.5-3.8, dimetilsulfóxido 4%, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02%.

Nota: Conservar protegido de la luz, la sustancia es sensible a la iluminación fuerte.

7. Ácido Sulfúrico: H₂SO₄ 0.3 M

1x15 ml/vial Contiene solución de H₂SO₄ 0.3 M.

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

8. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60 ml/vial. Contiene 2% de caseína, tampón citrato sódico 10mM a pH 6.0 +/-0.1, 0.1% de Tween 20, además azida sódica al 0.09% y ProClin 300 0,045% como conservantes. Utilizar para diluir la muestra.

Codificado con color azul.

9. Sellador adhesivo n.º 2

10. Hoja de instrucciones n.º 1

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (1000, 100 y 10 µl) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para eliminar oxidantes químicos usados como desinfectantes).
3. Temporizador con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) ajustado a 37°C (+/-0.5°C de tolerancia).
6. Lector calibrado de micropocillos de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y filtros de 620-630 nm (blanco).
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Agitador Vortex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo debe ser usado exclusivamente por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de realizar las pruebas deben llevar los indumentos protectores adecuados de

laboratorio, guantes sin talco y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). Todo el personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.

3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos ambientales cuando se abran los viales y las microplacas del equipo, así como durante la realización del ensayo. Proteger el cromógeno (TMB) de la luz fuerte y evitar las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar componentes de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos del mismo lote.
7. Comprobar que los reactivos sean transparentes y no contengan precipitados ni agregados visibles. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el equipo después de la fecha de caducidad indicada en el contenedor externo y en las etiquetas internas (viales). Según un estudio realizado sobre un equipo abierto, no se ha detectado pérdida relevante de actividad, en hasta seis usos por un período de hasta 3 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Todas las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de los componentes líquidos y para la transferencia de los componentes a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones cruzadas.
13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas y las leyes nacionales relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos procedentes del procedimiento de lavado, de restos de controles y muestras deben ser tratados como material potencialmente infeccioso e inactivarse antes de su eliminación. Se recomienda la inactivación con una concentración final de lejía al 10% durante 16-18 horas o la inactivación con calor mediante autoclave a 121 °C durante 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto o muestra, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas utilizadas para las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de

acuerdo a las directivas y leyes nacionales para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y ADVERTENCIAS.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar para la preparación de muestras en los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante códigos o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Se recomienda el uso de código de barras y lectura electrónica.
3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos y cuerpos microbianos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a –20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0.2-0.8µ.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y ADVERTENCIAS.

Microplacas:

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

De ser así, llame al servicio de atención al cliente de Dia.Pro. Las tiras de pocillos no utilizadas deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Cuando se abre por primera vez, las tiras sobrantes se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa con desecante cambia de amarillo a verde.

Curva de calibración

Componente listo para usar. Mezclar cuidadosamente en el agitador Vortex antes de usar.

Solución de lavado concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada y mezclarse delicadamente antes de usarse. Durante la preparación hay que evitar la formación de espuma y burbujas, que podrían reducir la eficiencia de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

Conjugado de enzima:

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

Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios ambientales.

En caso de que deba transferirse este componente, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Cromógeno/ Substrato:

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

Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios ambientales.

Evitar la exposición a la iluminación fuerte, agentes oxidantes y superficies metálicas.

En caso de que deba transferirse este componente, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Diluyente de muestras

Componente listo para usar. Mezclar cuidadosamente en un agitador Vortex antes de usar.

Ácido Sulfúrico:

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

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

Leyenda:

Indicación de peligro, **Frases H**

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, **Frases P**

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

1. Las micropipetas deben estar calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol al 70%, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/-2%. Deben descontaminarse periódicamente los residuos o derrames de los componentes del equipo.
2. La incubadora ELISA debe ser ajustada a +37°C (+/- 0.5°C de tolerancia) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los

rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.

4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de $\pm 5\%$.
5. El lector de microplaca ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro (620-630 nm, obligatorio) para reducir interferencias en la lectura. El rendimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda $\leq 10\text{nm}$ b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2.0 , c) Linealidad ≥ 2.0 , reproducibilidad $\geq 1\%$. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente debe procederse al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
6. En caso de usar un sistema automatizado ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de contaminación de pocillos adyacentes. Se recomienda el uso de sistemas automatizados de Elisa cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por serie.
7. El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para ajustar y comprobar los instrumentos a usar en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos. También se ofrece apoyo para la instalación de nuevos instrumentos a usar con el equipo.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los componentes líquidos no están contaminados con partículas ni agregados visibles.
3. Comprobar que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen con una pipeta estéril de plástico.
4. Comprobar que no han ocurrido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Comprobar que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no está perforada ni dañada.
5. Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
6. Dejar que los componentes restantes alcancen la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el agitador Vortex todos los reactivos líquidos.
7. Ajustar la incubadora de ELISA a +37°C y alimentar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número correcto de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
8. Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
9. Si se utiliza un sistema automatizado, encenderlo, comprobar la configuración y asegurarse de utilizar el protocolo de ensayo adecuado.
10. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.

11. Asegurarse de que el equipamiento restante esté disponible y listo para el uso.
12. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación. Es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

El equipo puede utilizarse también para determinaciones cualitativas y cuantitativas.

M1. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA:

1. Diluir las muestras 1:101 en un tubo de dilución adecuadamente definido (ejemplo: 1000 µl de diluyente de muestras + 10 µl de muestra). No diluir el conjunto de calibración ya que los calibradores están listos para el uso. Mezclar cuidadosamente todos los componentes líquidos en un agitador Vortex y después proceder como se describe a continuación.
2. Poner el número requerido de micropocillos en el soporte de micropocillos. Dejar los pocillos A1 y B1 vacíos para la operación de blanco.
3. A continuación, dispensar 100 µl de calibradores por duplicado. A continuación, dispensar 100 µl de muestras diluidas en cada pocillo adecuadamente identificado.
4. Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C**.

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

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

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

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

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se puede generar un fondo excesivo.

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

M2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Si sólo se requiere una determinación cualitativa, proceder como se describe a continuación:

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

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

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

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

7. Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C**.
8. Lavar los micropocillos como en el paso 5.
9. Dispensar 100 µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el pocillo de blanco. Incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se puede generar un fondo excesivo.

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

Notas generales importantes:

1. Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo del micropocillo antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de stop y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO.

Método	Operaciones
Calibradores	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
1^{ra} incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Paso de lavado	5 ciclos con 20" de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado de enzima	100 µl
2^{da} incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Paso de lavado	5 ciclos con 20" de remojo o 6 ciclos sin remojo
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3^{ra} incubación	20 min
Temperatura	t.a.
Ácido Sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450nm/620-630nm

A continuación se ofrece un ejemplo del esquema de dispensación para análisis cuantitativo:

Microplaca												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	CAL4	M3									
B	BL	CAL4	M4									
C	CAL1	CAL5	M5									
D	CAL1	CAL5	M6									
E	CAL2	CAL6	M7									
F	CAL2	CAL6	M8									
G	CAL3	M1	M9									
H	CAL3	M2	M10									

Leyenda: BL = Blanco CAL = Calibrador
SC = Suero de control M = Muestra

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado para ensayos cualitativos:

Microplaca												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M 3	M11									
B	CAL1	M 4	M12									
C	CAL1	M 5	M13									
D	CAL2	M 6	M14									
E	CAL2	M 7	M15									
F	CAL6	M 8	M16									
G	M1	M 9	M17									
H	M2	M10	M18									

Leyenda: BL = Blanco CAL = Calibradores
M = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza una comprobación para validar los controles siempre que se utiliza el equipo para verificar si el rendimiento del ensayo reúne las condiciones. Controlar que los datos siguientes coinciden:

Compruebe que:	Exigencia
Pocillo blanco	Valor < 0.150 DO450nm
CAL 1 0 arbU/ml	Valor medio < 0.200 de DO450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación < 30%
CAL 2 5 arbU/ml	DO450nm > DO450nm CAL1 + 0.100
CAL 6 100 arbU/ml	DO450nm > 1.000

Si los resultados del ensayo coinciden con la exigencia indicada arriba, pase a la siguiente sección.

En caso contrario, no continuar y hacer lo siguiente:

Problema	Compruebe que:
Pocillo blanco > 0.150	1. la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
CAL 1 0 arbU/ml > 0.200 DO450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación > 30%	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido alimentado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento de ensayo (dispensar el calibrador positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del calibrador negativo ni de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado de enzima. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas ni con el conjugado de enzima. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
CAL 2 5 arbU/ml DO450nm < DO450nm CAL1 + 0.100	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en su distribución (por ejemplo, dispensar un calibrador equivocado en su lugar). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
CAL 6 100 arbU/ml < 1.000 DO450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en la distribución (dispensar un calibrador equivocado en su lugar). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

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

Nota importante:

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

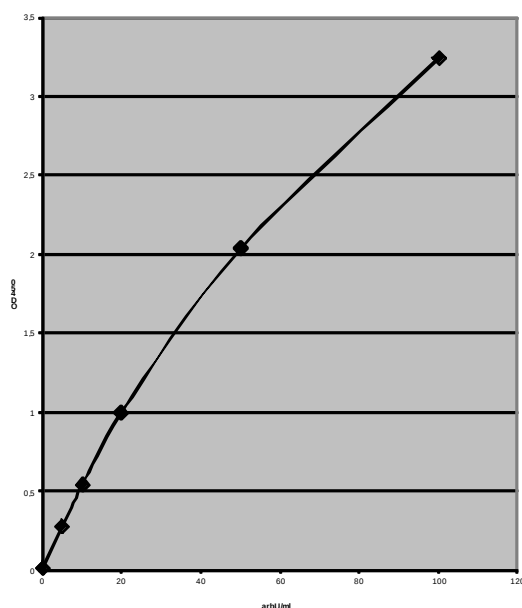
P. RESULTADOS

P.1 Método cuantitativo

Si la prueba es válida, usar el método cuantitativo y el programa de ajuste de curvas aprobado para trazar la curva de calibración a partir de los valores obtenidos de la lectura a 450nm/620-630nm (se sugiere la interpolación de 4 parámetros).

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

A continuación se describe un ejemplo de curva de calibración.



Nota importante:

No usar la curva de calibración anterior para hacer cálculos.

P.2 Método cualitativo

En el método cualitativo, calcular los valores medios de DO450nm/620-630nm para los calibradores 0 y 5 arbU/ml y, a continuación, comprobar que el ensayo es válido.

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

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

Calibrador 0 arbU/ml: 0.020 – 0.024 DO450nm
 Valor medio: 0.022 DO450nm
 Menor de 0.150 – Válido
 Calibrador 5 arbU/ml: 0.250 – 0.270 DO450nm
 Valor medio: 0.260 DO450nm
 Mayor que Cal 0 + 0.100 – Válido
 Calibrador 100 arbU/ml: 2.045 DO450nm
 Mayor de 1.000 – Válido

La DO450nm/620-630nm del calibrador 5 arbU/ml se considera el valor de corte (Co) del sistema.
 La relación entre el valor de DO450nm/620-630nm de la muestra y la DO450nm/620-630nm del calibrador 5 arbU/ml (M/Co) puede proporcionar una estimación semicuantitativa del contenido de anti C. Trachomatis específico en la muestra.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Las muestras con una concentración inferior a 5 arbU/ml se consideran negativas para anticuerpos IgG anti C. Trachomatis.

Las muestras con una concentración superior a 5 arbU/ml se consideran positivas para anticuerpos IgG anti C. Trachomatis.

Notas importantes:

1. Los resultados de esta prueba por sí solos no son suficientes para proporcionar un diagnóstico claro de

infección por *Chlamydia Trachomatis*. Deben realizarse otras pruebas diagnósticas (por ejemplo, PCR).

2. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
3. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
4. El diagnóstico debe ser realizado y comunicado al paciente por un médico calificado.

R. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

La evaluación del rendimiento ha sido realizada en paneles de muestras positivas y negativas con respecto a un equipo de referencia con marca CE.

1. Límite de detección.

Ningún estándar internacional para la detección de anticuerpos IgG anti C. Trachomatis ha sido definido hasta el momento por la Comunidad Europea.

A falta de dicho estándar, con el objetivo de garantizar una excelente y constante sensibilidad del dispositivo, fue definido un estándar de oro interno (IGS), a partir de un paciente con un historial de infección anterior.

2. Sensibilidad y especificidad diagnóstica:

La evaluación del rendimiento diagnóstico se realizó con muestras suministradas por un centro externo con gran experiencia en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

La **sensibilidad** del diagnóstico se estudió en más de 100 muestras positivas con el equipo de referencia. Las muestras positivas se recogieron de pacientes con un historial clínico de infección por *Chlamydia trachomatis*.

La **especificidad** diagnóstica se determinó utilizando paneles de más de 100 muestras, provenientes de individuos sanos y donantes de sangre, clasificadas como negativas mediante un equipo de referencia, incluyendo muestras con interferencias potenciales.

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

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

Se obtuvieron los siguientes valores a partir de la evaluación del rendimiento:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

3. Precisión:

Se ha calculado con tres muestras, una negativa, una débilmente positiva y una altamente positiva, examinadas en 16 réplicas en tres series separadas de tres lotes.

Los resultados se describen del modo siguiente:

CTG.CE: lote P1

Calibrador 0 ArbU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^{ra} serie	Valor promedio
DO450nm	0.075	0.080	0.078	0.078
Desviación estándar	0.005	0.007	0.007	0.006
CV %	7.1	8.7	8.8	8.2

Calibrador 5 ArbU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^a serie	Valor promedio
DO450nm	0.306	0.260	0.269	0.281
Desviación estándar	0.025	0.031	0.043	0.033
CV %	8.1	8.3	6.2	7.5

Calibrador 50 ArbU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^a serie	Valor promedio
DO450nm	1.760	1.508	1.692	1.653
Desviación estándar	0.086	0.061	0.066	0.07
CV %	4.9	4.1	3.9	4.3

CTG.CE: lote P2

Calibrador 0 ArbU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^a serie	Valor promedio
DO450nm	0.079	0.077	0.078	0.078
Desviación estándar	0.006	0.005	0.006	0.006
CV %	7.4	7.1	7.7	7.4

Calibrador 5 ArbU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^a serie	Valor promedio
DO450nm	0.271	0.265	0.266	0.267
Desviación estándar	0.019	0.019	0.019	0.019
CV %	7.1	7.3	7.0	7.2

Calibrador 50 ArbU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^a serie	Valor promedio
DO450nm	1.638	1.651	1.647	1.645
Desviación estándar	0.059	0.053	0.058	0.057
CV %	3.6	3.2	3.5	3.4

CTG.CE: lote P3

Calibrador 0 ArbU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^a serie	Valor promedio
DO450nm	0.078	0.080	0.078	0.079
Desviación estándar	0.005	0.006	0.006	0.006
CV %	7.0	7.5	7.2	7.2

Calibrador 5 ArbU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^a serie	Valor promedio
DO450nm	0.269	0.276	0.271	0.272
Desviación estándar	0.020	0.019	0.020	0.020
CV %	7.3	6.9	7.4	7.2

Calibrador 50 ArbU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^a serie	Valor promedio
DO450nm	1.578	1.595	1.608	1.594
Desviación estándar	0.053	0.049	0.054	0.052
CV %	3.3	3.1	3.4	3.3

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

4. Precisión

La precisión del ensayo se ha comprobado con las pruebas de dilución y recuperación. Se descartó cualquier "efecto gancho" (subestimación que probablemente ocurriría con dosis altas de analito).

Nota importante:

Los datos de rendimiento se obtuvieron siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11.

S. LIMITACIONES

La contaminación bacteriana o la inactivación con calor de la muestra pueden afectar los valores de absorbancia de las muestras con la consecuente alteración de nivel del analito.

Las muestras que tras ser descongeladas presentan partículas de fibrina o agregados pueden generar algunos resultados falsos.

El ensayo es útil sólo para probar muestras independientes y no mezclas.

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no debe establecerse en base a un solo resultado, sino que deben tenerse en consideración la historia clínica del paciente, la sintomatología, así como otros datos diagnósticos.

T. BIBLIOGRAFÍA.

- Bas S, Genevay S, Schenkel MC, Vischer TL. Importance of species-specific antigens in the serodiagnosis of Chlamydia Trachomatis reactive arthritis. Rheumatology (Oxford). 2002 Sep;41(9):1017-20. PMID: 12209035 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Marston EL, James AV, Parker JT, Hart JC, Brown TM, Messmer TO, Jue DL, Black CM, Carlone GM, Ades EW, Sampson J. Newly characterized species-specific immunogenic Chlamydia pneumoniae peptide reactive with murine monoclonal and human serum antibodies. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 Mar;9(2):446-52. PMID: 11874892 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Morré SA, Munk C, Persson K, Krüger-Kjaer S, van Dijk R, Meijer CJ, van Den Brule AJ. Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of Chlamydia Trachomatis antibodies. J Clin Microbiol. 2002 Feb;40(2):584-7. PMID: 11825974 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Bas S, Muzzin P, Vischer TL. Chlamydia Trachomatis serology: diagnostic value of outer membrane protein 2 compared with that of other antigens. J Clin Microbiol. 2001 Nov;39(11):4082-5. PMID: 11682533 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Bas S, Muzzin P, Ninet B, Bornand JE, Scieux C, Vischer TL. Chlamydial serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. J Clin Microbiol. 2001 Apr;39(4):1368-77. PMID: 11283058 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Klein M, Kötz A, Bernardo K, Krönke M. Detection of Chlamydia pneumoniae-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the major outer membrane protein. J Clin Microbiol. 2003 May;41(5):1957-62. PMID: 12734234 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S. Detection of Chlamydia Trachomatis-specific antibodies in human sera by recombinant major outer-membrane protein polyantigens. J Med Microbiol. 2000 May;49(5):457-65. PMID: 10798559 [PubMed - indexed for MEDLINE]

8. Jones CS, Maple PA, Andrews NJ, Paul ID, Caul EO.Measurement of IgG antibodies to Chlamydia Trachomatis by commercial enzyme immunoassays and immunofluorescence in sera from pregnant women and patients with infertility, pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy, and laboratory diagnosed Chlamydia psittaci/Chlamydia pneumoniae infection.J Clin Pathol. 2003 Mar;56(3):225-9.PMID: 12610104 [PubMed - indexed for MEDLINE]
9. Portig I, Goodall JC, Bailey RL, Gaston JS.Characterization of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2 in chlamydial infection.Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jan;10(1):103-7.PMID: 12522047 [PubMed - indexed for MEDLINE]
10. Bas S, Vischer TL.Chlamydia Trachomatis antibody detection and diagnosis of reactive arthritis.Br J Rheumatol. 1998 Oct;37(10):1054-9.PMID: 9825743 [PubMed - indexed for MEDLINE]
11. Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S.Analysis of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2.Clin Diagn Lab Immunol. 1998 May;5(3):313-8.PMID: 9605983 [PubMed - indexed for MEDLINE]
12. Bas S, Scieux C, Vischer TL.Different humoral immune response to Chlamydia Trachomatis major outer membrane protein variable domains I and IV in Chlamydia-infected patients with or without reactive arthritis.Arthritis Rheum. 1999 May;42(5):942-7.PMID: 10323449 [PubMed - indexed for MEDLINE]
13. Neuer A, Lam KN, Tiller FW, Kiesel L, Witkin SS.Humoral immune response to membrane components of Chlamydia Trachomatis and expression of human 60 kDa heat shock protein in follicular fluid of in-vitro fertilization patients.Hum Reprod. 1997 May;12(5):925-9.PMID: 9194641 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el mercado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

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



0318

Chlamydia Trachomatis IgM

**Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for
the qualitative
determination of IgM antibodies to
Chlamydia Trachomatis
in human serum and plasma**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

Chlamydia Trachomatis IgM

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the determination of IgM antibodies to Chlamydia Trachomatis in human plasma and sera. For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

Chlamydia trachomatis is a bacterium-like obligate intracellular organism that counts at least 15 recognized serotypes. C.trachomatis is one of the three distinct species within the genus Chlamydia (trachomatis, psittaci and pneumoniae). C.trachomatis infection in adults is responsible of most of sexually acquired urethritis in men, mucopurulent cervicitis in women, pelvic inflammatory disease, lymphogranuloma venereum, most of acute urethral syndromes, ocular infections, proctocolitis and epididymitis. In infants, the organism is responsible of pneumonia and conjunctivitis. Infections due to C.trachomatis stimulates the patient to generate a strong immunological response both in IgG, lasting a long time, and IgA and IgM, whose presence is more correlated with an ongoing infection or a recent event. The determination of species-specific IgG, IgM and IgA is a helpful tool for the clinician to identify the infective agent and to decide the right therapy.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with a species-specific polypeptide derived from C.trachomatis major outer membrane antigen. In the 1st incubation, the solid phase is treated with diluted samples and anti-CT IgM are captured, if present, by the antigens. After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti-CT IgM are detected by the addition of anti hIgM antibody, labeled with peroxidase (HRP). The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti-CT IgM antibodies present in the sample. The presence of IgM in the sample may therefore be determined by means of a cut-off value able to discriminate between negative and positive samples. Neutralization of IgG anti-CT, carried out directly in the well, is performed in the assay in order to block interferences due to this class of antibodies in the determination of IgM.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 microwells coated with CT specific immunodominant native antigens *in presence of bovine proteins*. Plates are sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

2. Negative Control: CONTROL -

1x4.0 ml/vial. Ready to use. It contains, human IgM antibodies negative to Ch. Trach., 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The Negative Control is pale yellow color coded.

3. Positive Control: CONTROL +

1x4.0 ml/vial. Ready to use. It contains high titer human IgM antibodies positive to Ch. Trach., 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The Positive Control is green yellow color coded.

4. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle20x concentrated solution. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

5. Enzyme conjugate : CONJ

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

6. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

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

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

7. Sulphuric Acid: H2SO4 0.3 M

1x15ml/vialIt contains 0.3 M H₂SO₄ solution. Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

8. Specimen Diluent: DILSPE

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

9. Neutralizing Reagent: SOLN NEUT

1x8ml/vial. It contains goat anti hIgG, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

10. Plate sealing foils n°2

11. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for

Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.

4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-borne microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.

5. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.

6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.

7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.

8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.

9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.

10. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit did not pointed out any relevant loss of activity up to six uses of the device and up to 3 months.

11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

12. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.

13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..

14. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.

15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water

16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.

2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.

3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.

5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of manufacturing.

In this case call Dia.Pro's customer service.

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

Negative Control

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

Positive Control

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

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

Sample Diluent

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

Neutralizing Reagent

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

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/- 0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested). 5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing. An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of $\pm 5\%$.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter (620-630nm, mandatory) for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0 ; (c) linearity to ≥ 2.0 ; repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition,

the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.

7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
6. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
7. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
8. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
9. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
10. Check that the micropipettes are set to the required volume.
11. Check that all the other equipment is available and ready to use.
12. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 μ l Sample Diluent + 10 μ l sample). Do not dilute the Controls as they are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.
3. Dispense 50 μ l Neutralizing Reagent in all the wells, except A1 used for blanking operations and in the wells used for the Positive and Negative Controls.

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

4. Dispense 100 μ l of Negative Control in triplicate, 100 μ l of Positive Control in duplicate and 100 μ l of diluted samples in each properly identified well.

5. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

6. Wash the microplate with an automatic as reported previously (section I.3).
7. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the A1 well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

8. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
9. Wash microwells as in step 6.
10. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

11. Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 10. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
12. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

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

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Neutralizing Reagent (only for samples)	50 µl
Control	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm/620-630nm

An example of dispensation scheme is reported in the table below:

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

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

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as expected and required by the IVDD directive 98/79/EC. Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
Negative Control	< 0.150 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
Positive Control	OD450nm > 0.750

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.
If they do not, do not proceed any further and operate as follows:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Sustrate solution has not got contaminated during the assay
Negative Control > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive control instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative control or of their wells has occurred due spills of positive samples or the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
Positive Control < 0.750 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong control) ; 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

Important note:

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 12.

P. RESULTS

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

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

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

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as a ratio of the sample OD450nm/620-630nm value (S) and the cut-off value (Co), or S/Co, according to the following table:

S/Co	Interpretation
< 0.9	Negative
$0.9 \leq S/Co < 1.0$	Equivocal
≥ 1.0	Positive

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

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

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

Important notes:

1. C. Trachomatis IgM results alone are not enough to provide a clear diagnosis of Chlamydia Trachomatis infection. Other tests for Chl. Trachomatis (supplied by Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. at code CTA.CE and CTG.CE), should be carried out.
2. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
3. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
4. Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 12):

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

Negative Control: 0.100 – 0.120 – 0.080 OD450nm
Mean Value: 0.100 OD450nm
Lower than 0.150 – Accepted

Positive Control: 1.000 OD450nm
Higher than 0.750 – Accepted

$$\text{Cut-Off} = 0.100 + 0.250 = 0.350$$

Sample 1: 0.080 OD450nm
Sample 2: 1.800 OD450nm
Sample 1 S/Co < 0.9 = negative
Sample 2 S/Co ≥ 1.0 = positive

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted on panels of positive and negative samples with reference to a CE marked reference kit.

1. Limit of detection

No international standard for Ch. Trachomatis IgM Antibody detection has been defined so far by the European Community. In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient with an history of past Ch. Trachomatis infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The diagnostic performances were evaluated on samples supplied by two external centers, with excellent experience in the diagnosis of infectious diseases.

The diagnostic **sensitivity** was studied on more than 60 samples, positive with the reference kit. Positive samples were collected from patients with a clinical history of Chlamydia trachomatis infection.

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

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

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

Potentially interfering samples (pregnancy, emolyzed, lipemic, RF+) were tested.

No crossreaction was observed.

The Performance Evaluation provided the following values :

Sensitivity	$\geq 98 \%$
Specificity	$\geq 98 \%$

3. Precision:

It has been calculated on three samples, a negative, a low positive and a high positive, examined in 16 replicates in three separate runs for three lots.

Results are reported as follows:

CTM.CE: lot P1

Negative Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.051	0.051	0.053	0.052
Std.Deviation	0.005	0.006	0.006	0.006
CV %	10.1	10.9	10.8	10.6

Low Positive Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.616	0.609	0.607	0.610
Std.Deviation	0.051	0.048	0.046	0.048
CV %	8.2	7.8	7.6	7.9

High Positive Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	1.255	1.270	1.262	1.262
Std.Deviation	0.050	0.049	0.058	0.052
CV %	4.0	3.9	4.6	4.1

CTM.CE: lot P2

Negative Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.050	0.048	0.049	0.049
Std.Deviation	0.005	0.005	0.005	0.005
CV %	10.4	10.0	10.2	10.2

Low Positive Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.603	0.591	0.596	0.596
Std.Deviation	0.048	0.046	0.045	0.046
CV %	8.0	7.8	7.5	7.7

High Positive Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	1.212	1.231	1.245	1.229
Std.Deviation	0.049	0.043	0.051	0.048
CV %	4.0	3.5	4.1	3.9

CTM.CE: lot P3

Negative Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.051	0.050	0.050	0.050
Std.Deviation	0.005	0.005	0.005	0.005
CV %	10.0	9.9	9.4	9.8

Low Positive Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.618	0.615	0.616	0.616
Std.Deviation	0.049	0.046	0.045	0.047
CV %	7.9	7.5	7.4	7.6

High Positive Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	1.216	1.239	1.233	1.229
Std.Deviation	0.048	0.046	0.050	0.048
CV %	3.9	3.7	4.1	3.9

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

4. Accuracy

The assay accuracy has been checked by the dilution test. Any "hook effect", underestimation likely to happen at high doses of analyte, was ruled out.

Important note:

The performance data have been obtained proceeding as the reading step described in the section M, point 12

S. LIMITATIONS

Bacterial contamination or heat inactivation of the specimen may affect the absorbance values of the samples with consequent alteration of the level of the analyte. Frozen samples containing fibrin particles or aggregates after thawing may generate some false results.

This test is suitable only for testing single samples and not pooled ones.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. The patient's clinical history, symptomatology, as well as other diagnostic data should be considered.

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

T. REFERENCES

- Bas S, Genevay S, Schenkel MC, Vischer TL. Importance of species-specific antigens in the serodiagnosis of Chlamydia trachomatis reactive arthritis. Rheumatology (Oxford). 2002 Sep;41(9):1017-20. PMID: 12209035 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Marston EL, James AV, Parker JT, Hart JC, Brown TM, Messmer TO, Jue DL, Black CM, Carlone GM, Ades EW, Sampson J. Newly characterized species-specific immunogenic Chlamydia pneumoniae peptide reactive with murine monoclonal and human serum antibodies. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 Mar;9(2):446-52. PMID: 11874892 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Morré SA, Munk C, Persson K, Krüger-Kjaer S, van Dijk R, Meijer CJ, van Den Brule AJ. Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of Chlamydia trachomatis antibodies. J Clin Microbiol. 2002 Feb;40(2):584-7. PMID: 11825974 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Bas S, Muzzin P, Vischer TL. Chlamydia trachomatis serology: diagnostic value of outer membrane protein 2 compared with that of other antigens. J Clin Microbiol. 2001 Nov;39(11):4082-5. PMID: 11682533 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Bas S, Muzzin P, Ninet B, Bornand JE, Scieux C, Vischer TL. Chlamydial serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. J Clin Microbiol. 2001 Apr;39(4):1368-77. PMID: 11283058 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Klein M, Kötz A, Bernardo K, Krönke M. Detection of Chlamydia pneumoniae-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the major outer membrane protein. J Clin Microbiol. 2003 May;41(5):1957-62. PMID: 12734234 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S. Detection of Chlamydia trachomatis-specific antibodies in human sera by recombinant major outer-membrane protein polyantigens. J Med Microbiol. 2000 May;49(5):457-65. PMID: 10798559 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Jones CS, Maple PA, Andrews NJ, Paul ID, Caul EO. Measurement of IgG antibodies to Chlamydia trachomatis by commercial enzyme immunoassays and immunofluorescence in sera from pregnant women and patients with infertility, pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy, and laboratory diagnosed Chlamydia psittaci/Chlamydia pneumoniae infection. J Clin Pathol. 2003 Mar;56(3):225-9. PMID: 12610104 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Portig I, Goodall JC, Bailey RL, Gaston JS. Characterization of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2 in chlamydial infection. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jan;10(1):103-7. PMID: 12522047 [PubMed - indexed for MEDLINE]

10. Bas S, Vischer TL. Chlamydia trachomatis antibody detection and diagnosis of reactive arthritis. Br J Rheumatol. 1998 Oct;37(10):1054-9. PMID: 9825743 [PubMed - indexed for MEDLINE]
11. Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S. Analysis of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2. Clin Diagn Lab Immunol. 1998 May;5(3):313-8. PMID: 9605983 [PubMed - indexed for MEDLINE]
12. Bas S, Scieux C, Vischer TL. Different humoral immune response to Chlamydia trachomatis major outer membrane protein variable domains I and IV in Chlamydia-infected patients with or without reactive arthritis. Arthritis Rheum. 1999 May;42(5):942-7. PMID: 10323449 [PubMed - indexed for MEDLINE]
13. Neuer A, Lam KN, Tiller FW, Kiesel L, Witkin SS. Humoral immune response to membrane components of Chlamydia trachomatis and expression of human 60 kDa heat shock protein in follicular fluid of in-vitro fertilization patients. Hum Reprod. 1997 May;12(5):925-9. PMID: 9194641 [PubMed - indexed for MEDLINE].

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

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



0318

Chlamydia Trachomatis IgM

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para
la determinación
cualitativa de anticuerpos IgM anti
Chlamydia Trachomatis
en plasma y sueros humanos**

- Uso exclusivo para diagnóstico “in vitro” -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 26007726

e-mail: info@diapro.it

Chlamydia Trachomatis IgM

A OBJETIVO DEL EQUIPO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos IgM anti Chlamydia Trachomatis en plasma y suero humanos.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN

Chlamydia trachomatis es un organismo intracelular obligado de tipo bacteriano que cuenta al menos con 15 serotipos reconocidos. C. trachomatis es una de las tres especies distintas del género Chlamydia (trachomatis, psittaci y pneumoniae).

La infección por C. trachomatis en adultos es responsable de la mayoría de uretritis de transmisión sexual en hombres, cervicitis mucopurulenta en mujeres, enfermedad inflamatoria pélvica, linfogranuloma venéreo, la mayoría de síndromes uretrales agudos, infecciones oculares, coloproctitis y epididimitis. En bebés, el organismo es responsable de neumonía y conjuntivitis.

Las infecciones debidas a C. Trachomatis estimulan que el paciente genere una fuerte respuesta inmunológica tanto en IgG, muy duradera, como en IgA e IgM, cuya presencia guarda más correlación con una infección en curso o un episodio reciente.

La determinación de IgG, IgM e IgA específicas de la especie es una herramienta útil para que el clínico identifique el agente infeccioso y para decidir la terapia adecuada.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

Las microplacas están recubiertas con un polipéptido específico de la especie derivado del antígeno principal de la membrana externa de C. Trachomatis.

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

El enzima capturado en la fase sólida, combinado con la mezcla sustrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgM anti-CT presentes en la muestra.

Por lo tanto, la presencia de IgM en la muestra puede determinarse por medio de un valor de corte capaz de discriminar entre muestras negativas y positivas.

La neutralización de IgG anti-CT, que se lleva a cabo directamente en el pocillo, se ejecuta en el ensayo para bloquear interferencias debidas a esta clase de anticuerpos en la determinación de IgM.

D. COMPONENTES

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplacas: MICROPLATE

12 tiras de 8 pocillos recubiertos con antígenos nativos inmunodominantes específicos de CT *en presencia de proteínas de bovino*. Las placas se encuentran en una bolsa sellada con desecante.

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

2. Control negativo: CONTROL -

1x4.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene anticuerpos IgM humanos negativos para Ch. Trach., 2% de caseína, tampón de citrato sódico 10 mM a pH 6.0+/-0.1, 0.1% de Tween 20, además de azida sódica al 0.09% y ProClin 300 al 0.045% como conservantes.

El control negativo está codificado con el color amarillo.

3. Control positivo: CONTROL +

1x4.0ml/vial. Listo para el uso. Contiene alto título de anticuerpos IgM humanos positivos para C. Trach., 2% de caseína, tampón de citrato sódico 10 mM a pH 6.0+/-0.1, 0.1% de Tween 20, además de azida sódica al 0.09% y ProClin 300 al 0.045% como conservantes.

El control positivo está codificado con el color verde-amarillo.

4. Solución de lavado concentrada: WASHBUF 20X

1x60ml/botella, solución concentrada 20x.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% de Tween 20 y ProClin 300 al 0,045%.

5. Conjugado de enzima: CONJ

1x16ml/vial. Listo para el uso y codificado con color rojo. Contiene anticuerpos policlonales de cabra anti IgM humana conjugados con peroxidasa (HRP), 5% de albúmina de suero bovino (BSA), tampón Tris 10 mM a pH 6,8+/-0.1, y ProClin 300 al 0.045% y sulfato de gentamicina al 0.02% como conservantes.

6. Cromógeno/ Substrato: SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 3.5-3.8, dimetilsulfóxido 4%, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02%.

Nota: Conservar protegido de la luz, la sustancia es sensible a la iluminación fuerte.

7. Ácido Sulfúrico: H₂SO₄ 0.3 M

1x15 ml/vial Contiene solución de H₂SO₄ 0.3 M.

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

8. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60 ml/vial. Contiene 2% de caseína, tampón citrato sódico 10mM a pH 6.0 +/-0.1, 0.1% de Tween 20, además azida sódica al 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes. Utilizar para diluir la muestra.

9. Reactivo neutralizante: SOLN NEUT

1x8 ml/vial. Contiene anti hIgG de cabra, 2% de caseína, tampón citrato sódico 10 mM a pH 6.0 +/-0.1, azida sódica al 0.09% y ProClin 300 al 0.0.045% como conservantes.

10. Sellador adhesivo n.º 2

11. Hoja de instrucciones n.º 1

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (1000, 100 y 10 µl) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para eliminar oxidantes químicos usados como desinfectantes).
3. Temporizador con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) ajustado a +37°C (+/-0.5°C de tolerancia).
6. Lector calibrado de micropocillos de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y filtros de 620-630 nm (blanco).
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Agitador Vortex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo debe ser usado exclusivamente por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de realizar las pruebas deben llevar los indumentos protectores adecuados de

laboratorio, guantes sin talco y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). Todo el personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.

3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos ambientales cuando se abran los viales y las microplacas del equipo, así como durante la realización del ensayo. Proteger el cromógeno (TMB) de la luz fuerte y evitar las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar componentes de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos del mismo lote.
7. Comprobar que los reactivos sean transparentes y no contengan precipitados ni agregados visibles. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/ plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el equipo después de la fecha de caducidad indicada en el contenedor externo y en las etiquetas internas (viales). Según un estudio realizado sobre un equipo abierto, no se ha detectado pérdida relevante de actividad, en hasta seis usos por un período de hasta 3 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Todas las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de los componentes líquidos y para la transferencia de los componentes a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones cruzadas.
13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos procedentes del procedimiento de lavado, de restos de controles y muestras deben ser tratados como material potencialmente infeccioso e inactivarse antes de su eliminación. Se recomienda la inactivación con una concentración final de lejía al 10% durante 16 a 18 horas o la inactivación con calor mediante autoclave a 121°C durante 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto o muestra, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas utilizadas para las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas y leyes nacionales para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y ADVERTENCIAS.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar para la preparación de muestras en los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante códigos o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Se recomienda el uso de código de barras y lectura electrónica.
3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos y cuerpos microbianos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0.2-0.8µ.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y ADVERTENCIAS.

Microplacas:

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

De ser así, llame al servicio de atención al cliente de Dia.Pro. Las tiras de pocillos no utilizadas deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Cuando se abre por primera vez, las tiras sobrantes se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa con desecante cambia de amarillo a verde.

Control negativo

Componentes listos para usar. Mezclar cuidadosamente en el agitador Vortex antes de usar.

Control Positivo

Componentes listos para usar. Mezclar cuidadosamente en el agitador Vortex antes de usar.

Solución de lavado concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada y mezclarse delicadamente antes de usarse. Durante la preparación hay que evitar la formación de espuma y burbujas, que podrían reducir la eficiencia de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

Conjugado de enzima:

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

Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios ambientales.

En caso de que deba transferirse este componente, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Cromógeno/ Substrato:

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

Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios ambientales.

Evitar la exposición a la iluminación fuerte, agentes oxidantes y superficies metálicas.

En caso de que deba transferirse este componente, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Diluyente de muestras

Componente listo para usar. Mezclar cuidadosamente en el agitador Vortex antes de usar.

Reactivo neutralizante

Reactivo listo para usar. Mezclar cuidadosamente en el agitador Vortex antes de usar.

Ácido Sulfúrico:

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

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

Leyenda:

Indicación de peligro, Frases H

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, Frases P

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

- Las micropipetas deben estar calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol al 70%, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%. Deben descontaminarse periódicamente los residuos o derrames de los componentes del equipo.
- La incubadora ELISA debe ser ajustada a +37°C (+/- 0.5°C de tolerancia) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
- El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los

rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.

- Los tiempos de incubación deben tener un margen de $\pm 5\%$.
- El lector de microplaca ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro (620-630 nm, obligatorio) para reducir interferencias en la lectura. El rendimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda $\leq 10\text{nm}$ b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2.0 , c) Linealidad ≥ 2.0 , reproducibilidad $\geq 1\%$. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente debe procederse al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
- En caso de usar un sistema automatizado ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de contaminación de pocillos adyacentes. Se recomienda el uso de sistemas automatizados de Elisa cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por serie.
- El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para ajustar y comprobar los instrumentos a usar en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos. También se ofrece apoyo para la instalación de nuevos instrumentos a usar con el equipo.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

- Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa (envase primario). No usar si ha caducado.
- Comprobar que los componentes líquidos no están contaminados con partículas ni agregados visibles.
- Comprobar que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen con una pipeta estéril de plástico.
- Comprobar que no han ocurrido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Comprobar que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no está perforada ni dañada.
- Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
- Dejar que los componentes restantes alcancen la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el agitador Vortex todos los reactivos líquidos.
- Ajustar la incubadora de ELISA a +37°C y alimentar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número correcto de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
- Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
- Si se utiliza un sistema automatizado, encenderlo, comprobar la configuración y asegurarse de utilizar el protocolo de ensayo adecuado.
- Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
- Asegurarse de que el equipamiento a usar esté disponible y listo para el uso.

12. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación. Es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

1. Diluir las muestras 1:101 en un tubo de dilución adecuadamente definido (ejemplo: 1000 µl de diluyente de muestras + 10 µl de muestra). No diluir los controles, ya que están listos para el uso. Mezclar cuidadosamente todos los componentes líquidos en un agitador Vortex y después proceder como se describe a continuación.
2. Poner el número de micropocillos en el soporte de micropocillos. Dejar el pocillo A1 vacío para la operación de blanco.
3. Dispensar 50 µl de reactivo neutralizante en todos los pocillos, excepto en A1 que se utiliza para operaciones de blanco y en los pocillos que se utilizan para los controles positivo y negativo.

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

4. Dispensar 100 µl de control negativo por triplicado, 100 µl de control positivo por duplicado y 100 µl de muestras diluidas en cada pocillo adecuadamente identificado.
5. Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C**.

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

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

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

8. Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C**.
9. Lavar los micropocillos como en el paso 6.
10. Dispensar 100 µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1. Incubar la microplaca a temperatura ambiente (**18-24°C**) durante 20 minutos.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se puede generar un fondo excesivo.

11. Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos, usando la misma secuencia que en el paso 10. La adición del ácido cambia el color de los calibradores positivos, del suero de control y de las muestras positivas de azul a amarillo.
12. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

Notas generales importantes:

1. Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de stop y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO.

Método	Operaciones
Reactivo neutralizante (sólo para muestras)	50 µl
Controls	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Paso de lavado	5 ciclos con 20" de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado de enzima	100 µl
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Paso de lavado	5 ciclos con 20" de remojo o 6 ciclos sin remojo
TMB/H2O2	100 µl
3ª incubación	20 min
Temperatura	t.a.
Ácido Sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450nm/620-630nm

En la tabla siguiente se describe un ejemplo del esquema de dispensado:

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

Legenda: BL = Blanco CN = Control Negativo
CP = Control positivo M = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se hace una comprobación para validar los controles siempre que se utiliza el equipo para verificar si el rendimiento del ensayo es el previsto y exigido por la directiva IVDD 98/79/CE. Controlar que los datos siguientes coinciden:

Compruebe que:	Exigencia
Pocillo blanco	Valor < 0.100 DO450nm
Control negativo	Valor medio ≤ 0,150 de DO450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación < 30%
Control Positivo	DO450nm > 0.750

Si los resultados del ensayo coinciden con con la exigencia indicada arriba, pase a la siguiente sección. En caso contrario, no continuar y hacer lo siguiente:

Problema	Compruebe que:
Pocillo blanco > 0.100 DO450nm	1. la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
Control negativo > 0.150 DO450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación > 30%	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido alimentado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento de ensayo (dispensar el control positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del control negativo ni de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado de enzima. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas ni con el conjugado de enzima. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
Control Positivo < 0.750 DO450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en la distribución (dispensar un control equivocado). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

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

Nota importante:

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

P. RESULTADOS

Si la prueba es válida, los resultados se calculan a partir del valor medio de DO450nm/620-630nm del control negativo (CN), mediante un valor de corte (Co) determinado con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de corte} = \text{CN} + 0.250$$

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

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

La interpretación de los resultados se realiza mediante la relación entre el valor de DO450nm/620-630nm de la muestra (M) y el valor de corte (Co), o M/Co. Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

M/Co	Interpretación
< 0.9	Negativo
$0.9 \leq M/Co < 1.0$	Equívoco
≥ 1.0	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no ha desarrollado anticuerpos IgM anti C. Trachomatis.

Los pacientes cuya muestra resulte no concluyente deben someterse a una nueva prueba con una segunda muestra tomada 1 o 2 semanas después de la inicial.

Un resultado positivo es indicativo de una infección en curso por C. Trachomatis y, por lo tanto, el paciente debe ser tratado en consecuencia.

Notas importantes:

- Los resultados de IgM anti C. Trachomatis por sí solos no son suficientes para proporcionar un diagnóstico claro de infección por Chlamydia Trachomatis. Deben realizarse otras pruebas de C. Trachomatis (suministradas por Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. con código CTA.CE y CTG.CE).
- La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
- Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
- El diagnóstico debe ser realizado y comunicado al paciente por un médico calificado.

A continuación se describe un ejemplo de los cálculos a realizar (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 12).

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

Control negativo: 0,100 – 0,120 – 0,080 DO450nm

Valor medio: 0.100 DO450nm

Menor de 0.150 – Válido

Control positivo: 1.000 DO450nm

Mayor de 0.750 – Válido

Valor de corte = $0.100 + 0.250 = 0.350$

Muestra 1: 0.080 DO450nm

Muestra 2: 1.800 DO450nm

Muestra 1 M/Co < 0.9 = negativa

Muestra 2 M/Co > 1.0 = positiva

R. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

La evaluación del rendimiento ha sido realizada en paneles de muestras positivas y negativas con respecto a un equipo de referencia con marca CE.

1. Límite de detección.

Ningún estándar internacional para la detección de anticuerpos IgM anti C. Trachomatis ha sido definido hasta el momento por la Comunidad Europea.

A falta de dicho estándar, con el objetivo de garantizar una excelente y constante sensibilidad del dispositivo, fue definido un estándar de oro interno (IGS), a partir de un paciente con un historial de infección anterior por C. Trachomatis.

2. Sensibilidad y especificidad diagnóstica:

La evaluación del rendimiento diagnóstico se realizó con muestras suministradas por dos centros externos con gran experiencia en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

La **sensibilidad** del diagnóstico se estudió en más de 60 muestras positivas con el equipo de referencia. Las muestras positivas se recogieron de pacientes con un historial clínico de infección por Chlamydia trachomatis.

La **especificidad** diagnóstica se determinó utilizando paneles de más de 100 muestras, provenientes de individuos sanos y donantes de sangre, clasificadas como negativas mediante un equipo de referencia, incluyendo muestras con interferencias potenciales.

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

Las muestras congeladas también se han probado para comprobar si la congelación interfiere con el rendimiento del

ensayo. No se ha observado interferencia a partir de muestras limpias y libres de partículas.

Se hicieron ensayos con muestras que potencialmente podían interferir (de embarazadas, hemolizadas, lipémicas, RF+).

No se han observado reacciones cruzadas.

Se obtuvieron los siguientes valores a partir de la evaluación del rendimiento:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

3. Precisión:

Se ha calculado con tres muestras, una negativa, una débilmente positiva y una altamente positiva, examinadas en 16 réplicas en tres series separadas de tres lotes.

Los resultados se describen del modo siguiente:

CTM.CE: lote P1

Muestra negativa (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^{ra} serie	Valor promedio
DO450nm	0.051	0.051	0.053	0.052
Desviación estándar	0.005	0.006	0.006	0.006
CV %	10.1	10.9	10.8	10.6

Muestra débilmente positiva (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^{ra} serie	Valor promedio
DO450nm	0.616	0.609	0.607	0.610
Desviación estándar	0.051	0.048	0.046	0.048
CV %	8.2	7.8	7.6	7.9

Muestra altamente positiva (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^{ra} serie	Valor promedio
DO450nm	1.255	1.270	1.262	1.262
Desviación estándar	0.050	0.049	0.058	0.052
CV %	4.0	3.9	4.6	4.1

CTM.CE: lote P2

Muestra negativa (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^{ra} serie	Valor promedio
DO450nm	0.050	0.048	0.049	0.049
Desviación estándar	0.005	0.005	0.005	0.005
CV %	10.4	10.0	10.2	10.2

Muestra débilmente positiva (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^{ra} serie	Valor promedio
DO450nm	0.603	0.591	0.596	0.596
Desviación estándar	0.048	0.046	0.045	0.046
CV %	8.0	7.8	7.5	7.7

Muestra altamente positiva (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^{ra} serie	Valor promedio
DO450nm	1.212	1.231	1.245	1.229
Desviación estándar	0.049	0.043	0.051	0.048
CV %	4.0	3.5	4.1	3.9

CTM.CE: lote P3

Muestra negativa (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^{ra} serie	Valor promedio
DO450nm	0.051	0.050	0.050	0.050
Desviación estándar	0.005	0.005	0.005	0.005
CV %	10.0	9.9	9.4	9.8

Muestra débilmente positiva (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^{ra} serie	Valor promedio
DO450nm	0.618	0.615	0.616	0.616
Desviación estándar	0.049	0.046	0.045	0.047
CV %	7.9	7.5	7.4	7.6

Muestra altamente positiva (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} serie	2 ^{da} serie	3 ^{ra} serie	Valor promedio
DO450nm	1.216	1.239	1.233	1.229
Desviación estándar	0.048	0.046	0.050	0.048
CV %	3.9	3.7	4.1	3.9

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

4. Precisión

La precisión del ensayo se ha comprobado con la prueba de dilución. Se descartó cualquier "efecto gancho" (subestimación que probablemente ocurriría con dosis altas de analito).

Nota importante:

Los datos de rendimiento se obtuvieron siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 12.

S. LIMITACIONES

La contaminación bacteriana o la inactivación con calor de la muestra pueden afectar los valores de absorbancia de las muestras con la consecuente alteración de nivel del analito. Las muestras que tras ser descongeladas presentan partículas de fibrina o agregados pueden generar algunos resultados falsos.

El ensayo es útil sólo para probar muestras independientes y no mezclas.

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no debe establecerse en base a un solo resultado, sino que deben tenerse en consideración la historia clínica del paciente, la sintomatología, así como otros datos diagnósticos.

Se ha evaluado falso positivo en menos del 2% de la población normal.

T. BIBLIOGRAFÍA

- Bas S, Genevay S, Schenkel MC, Vischer TL. Importance of species-specific antigens in the serodiagnosis of Chlamydia trachomatis reactive arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2002 Sep;41(9):1017-20. PMID: 12209035 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Marston EL, James AV, Parker JT, Hart JC, Brown TM, Messmer TO, Jue DL, Black CM, Carlone GM, Ades EW, Sampson J. Newly characterized species-specific immunogenic Chlamydia pneumoniae peptide reactive with murine monoclonal and human serum antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Mar;9(2):446-52. PMID: 11874892 [PubMed - indexed for MEDLINE]

3. Morré SA, Munk C, Persson K, Krüger-Kjaer S, van Dijk R, Meijer CJ, van Den Brule AJ. Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of Chlamydia trachomatis antibodies. J Clin Microbiol. 2002 Feb;40(2):584-7. PMID: 11825974 [PubMed - indexed for MEDLINE]
4. Bas S, Muzzin P, Vischer TL. Chlamydia trachomatis serology: diagnostic value of outer membrane protein 2 compared with that of other antigens. J Clin Microbiol. 2001 Nov;39(11):4082-5. PMID: 11682533 [PubMed - indexed for MEDLINE]
5. Bas S, Muzzin P, Ninet B, Bornand JE, Scieux C, Vischer TL. Chlamydial serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. J Clin Microbiol. 2001 Apr;39(4):1368-77. PMID: 11283058 [PubMed - indexed for MEDLINE]
6. Klein M, Kötz A, Bernardo K, Krönke M. Detection of Chlamydia pneumoniae-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the major outer membrane protein. J Clin Microbiol. 2003 May;41(5):1957-62. PMID: 12734234 [PubMed - indexed for MEDLINE]
7. Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S. Detection of Chlamydia trachomatis-specific antibodies in human sera by recombinant major outer-membrane protein polyanitigens. J Med Microbiol. 2000 May;49(5):457-65. PMID: 10798559 [PubMed - indexed for MEDLINE]
8. Jones CS, Maple PA, Andrews NJ, Paul ID, Caul EO. Measurement of IgG antibodies to Chlamydia trachomatis by commercial enzyme immunoassays and immunofluorescence in sera from pregnant women and patients with infertility, pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy, and laboratory diagnosed Chlamydia psittaci/Chlamydia pneumoniae infection. J Clin Pathol. 2003 Mar;56(3):225-9. PMID: 12610104 [PubMed - indexed for MEDLINE]
9. Portig I, Goodall JC, Bailey RL, Gaston JS. Characterization of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2 in chlamydial infection. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jan;10(1):103-7. PMID: 12522047 [PubMed - indexed for MEDLINE]
10. Bas S, Vischer TL. Chlamydia trachomatis antibody detection and diagnosis of reactive arthritis. Br J Rheumatol. 1998 Oct;37(10):1054-9. PMID: 9825743 [PubMed - indexed for MEDLINE]
11. Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S. Analysis of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2. Clin Diagn Lab Immunol. 1998 May;5(3):313-8. PMID: 9605983 [PubMed - indexed for MEDLINE]
12. Bas S, Scieux C, Vischer TL. Different humoral immune response to Chlamydia trachomatis major outer membrane protein variable domains I and IV in Chlamydia-infected patients with or without reactive arthritis. Arthritis Rheum. 1999 May;42(5):942-7. PMID: 10323449 [PubMed - indexed for MEDLINE]
13. Neuer A, Lam KN, Tiller FW, Kiesel L, Witkin SS. Humoral immune response to membrane components of Chlamydia trachomatis and expression of human 60 kDa heat shock protein in follicular fluid of in-vitro fertilization patients. Hum Reprod. 1997 May;12(5):925-9. PMID: 9194641 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el marcado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

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

CE
0318

CMV IgG

**Enzyme Immunoassay for the
quantitative/qualitative determination of
IgG antibodies to Cytomegalovirus
in human serum and plasma**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

Code: CMVG.CE
96 Tests

CMV IgG

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the quantitative/qualitative determination of IgG antibodies to Cytomegalovirus in plasma and sera.

For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

Cytomegalovirus or CMV is an ubiquitous human pathogen, whose infection is particularly prevalent among children and young adults. Infections by CMV continue to be an important health problem in certain patient populations, such as newborns, graft recipients of solid organs or bone marrow and AIDS patients. In these groups CMV is a major cause of morbidity and mortality.

The detection of virus-specific IgG and IgM antibodies is of great value in the diagnosis of acute/primary virus infections or reactivation of a latent one, in the absence of typical clinical symptoms. Asymptomatic infections usually happen for CMV in apparently healthy individuals, during pregnancy and several diseases as a coinfective agent.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with native Cytomegalovirus antigens, highly purified by sucrose gradient centrifugation and inactivated.

The solid phase is first treated with the diluted sample and IgG to Cytomegalovirus are captured, if present, by the antigens. After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti Cytomegalovirus IgG are detected by the addition of polyclonal specific anti hIgG antibodies, labelled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti Cytomegalovirus IgG antibodies present in the sample. A Calibration Curve, calibrated against the 1st W.H.O international standard, makes possible a quantitative determination of the IgG antibody in the patient.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 microwells coated with highly purified and UV inactivated Cytomegalovirus in presence of bovine proteins. Plates are sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 2..8°C.

2. Calibration Curve: CAL N° ...

Ready to use and color coded standard curve derived from human plasma positive for CMV IgG and titrated on WHO standard (proposed International Standard) ranging:

4ml CAL 1 = 0 WHO IU/ml

4ml CAL 2 = 0,5 WHO IU/ml

2ml CAL 3 = 1 WHO IU/ml

2ml CAL 4 = 2 WHO IU/ml

2ml CAL 5 = 4 WHO IU/ml

4ml CAL 6 = 8 WHO IU/ml.

Standards are calibrated against W.H.O proposed international standard for anti-CMV IgG (document BS/95.1814).

It contains human serum proteins, 2% casein, 10 mM Tris-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. Standards are blue colored.

3. Control Serum: CONTROL ...ml

1 vial. Lyophilized. It contains fetal bovine serum proteins, human IgG antibodies to CMV calibrated at 2 WHO IU/ml $\pm$ 10%, 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

Note: The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label.

4. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle20x concentrated solution.

Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

5. Enzyme conjugate : CONJ

2x8ml/vial. Ready to use and red colour coded. It contains Horseradish peroxidase conjugated polyclonal antibodies to human IgG, 5% BSA, 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 0.045% ProClin 300, 0.02% gentamicine sulphate as preservatives and 0.01% red alimentary dye.

6. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

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

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

7. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vial. It contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

8. Specimen Diluent: DILSPE

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Tris-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The reagent is blue colour coded.

9. Plate sealing foils n°2

10. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

Doc.:	INS CMVG.CE/eng	Page	3 of 9	Rev.: 5	Date: 2019/11
-------	-----------------	------	--------	---------	---------------

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

3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.

4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-borne microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.

5. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.

6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.

7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.

8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.

9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.

10. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit did not pointed out any relevant loss of activity up to six 6 uses of the device and up to 3 months.

11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

12. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.

13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..

14. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.

15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water

16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.

2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.

3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results.

Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection.

Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.

5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

6. Samples whose anti-CMV IgG antibody concentration is expected to be higher than 8 IU/ml should be diluted before use, either 1:10 or 1:100 in the Calibrator 0 IU/ml. Dilutions have to be done in clean disposable tubes by diluting 50 ul of each specimen with 450 ul of Cal 0 (1:10). Then 50 ul of the 1:10 dilution are diluted with 450 ul of the Cal 0 (1:100). Mix tubes thoroughly on vortex and then proceed toward the dilution step reported in section M.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-uses of the device and up to 3 months.

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant has not turned dark green, indicating a defect in manufacturing.

In this case, call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back into the aluminum pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°..8°C.

After first opening, remaining strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

Calibration Curve

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

Control Serum

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilised powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex.

Note: The control after dissolution is not stable. Store frozen in aliquots at -20°C.

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

Doc.:	INS CMVG.CE/eng	Page	4 of 9	Rev.: 5	Date: 2019/11
-------	-----------------	------	--------	---------	---------------

Sample Diluent

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

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/-0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).
5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.
An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of ±5%.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0; (c) linearity to ≥ 2.0; repeatability ≥ 1%. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure

that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.

6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Validation of Test" and "Assay Performances". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dissolve the content of the lyophilised Control Serum as reported in the proper section.
6. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
7. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
8. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
9. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
10. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
11. Check that the micropipettes are set to the required volume.
12. Check that all the other equipment is available and ready to use.
13. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing.
The kit may be used for quantitative and qualitative determinations as well.

M1. QUANTITATIVE DETERMINATION:

Automated assay:

In case the test is carried out automatically with an ELISA system, we suggest to make the instrument aspirate 1000 µl

Sample Diluent and then 10 µl sample (1:101 dilution factor). The whole content is then dispensed into a properly defined dilution tube. Before the next sample is aspirated, needles have to be duly washed to avoid any cross-contamination among samples. When all the samples have been diluted make the instrument dispense 100 µl samples into the proper wells of the microplate.

This procedure may be carried out also in two steps of dilutions of 1:10 each (90 µl Sample Diluent + 10 µl sample) into a second dilution platform. Make then the instrument aspirate first 100 µl Sample Diluent, then 10 µl liquid from the first dilution in the platform and finally dispense the whole content in the proper well of the assay microplate.

Do not dilute Calibrators and the dissolved Control Serum as they are ready to use.

Dispense 100 µl calibrators/control in the appropriate calibration/control wells.

For the next operations follow the operative instructions reported below for the Manual Assay.

It is strongly recommended to check that the time lap between the dispensation of the first and the last sample will be calculated by the instrument and taken into consideration by delaying the first washing operation accordingly.

Manual assay:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of microwells in the microwell holder. Leave the A1 and B1 empty for the operation of blanking.
3. Dispense 100 µl of Calibrators and 100 µl Control Serum in duplicate. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
4. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

5. Wash the microplate with an automatic washer by delivering and aspirating as reported previously (section I.3).
6. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except A1+B1 blanking wells, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1 and B1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

7. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
8. Wash microwells as in step 5.
9. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank wells A1 and B1 included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

10. Pipette 100 µl Sulphuric Acid to stop the enzymatic reaction into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
11. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1 or B1 or both.

M2. QUALITATIVE DETERMINATION

If only a qualitative determination is required, proceed as described below:

Automated assay:

Proceed as described in section M1.

Manual assay:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.
3. Dispense 100 µl Calibrator 0 IU/ml and 100 µl Calibrator 0.5 IU/ml in duplicate, and 100 µl Calibrator 8 IU/ml in single. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
4. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

5. Wash the microplate with an automatic washer by delivering and aspirating as reported previously (section I.3).
6. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the A1 well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

7. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
8. Wash microwells as in step 5.
9. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

10. Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
11. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

1. Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.
2. Reading has to be carried out just after the addition of the Stop Solution and anyway not any longer than 20 minutes after its addition. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to high background.
3. The Control Serum (CS) does not affect the test results calculation. The Control Serum may be used only when a laboratory internal quality control a laboratory internal quality control is required by the management.

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Calibrators & Control	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm / 620-630nm

An example of dispensation scheme for Quantitative Analysis is reported below:

Microplate												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S 1									
B	BLK	CAL4	S 2									
C	CAL1	CAL5	S 3									
D	CAL1	CAL5	S 4									
E	CAL2	CAL6	S 5									
F	CAL2	CAL6	S 6									
G	CAL3	CS	S 7									
H	CAL3	CS	S 8									

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrator CS = Control Serum S = Sample

An example of dispensation scheme in qualitative assays is reported below:

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

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrator CS = Control Serum S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls and the calibrator any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as expected and required by the IVDD directive 98/79/EC. Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
Calibrator 0 IU/ml (CAL1)	< 0.150 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
Calibrator 0.5IU/ml	OD450nm > OD450nm CAL1 + 0.100
Calibrator 8 IU/ml	OD450nm > 1.000
Control Serum	2 WHO IU/ml +/-10%

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

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

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not got contaminated during the assay
Calibrator 0 IU/ml > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive calibrator instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative calibrator or of their wells has occurred due to positive samples, to spills or to the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

Calibrator 0.5 IU/ml OD450nm < OD450nm CAL1 + 0.100	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (ex.: dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
Calibrator 8 IU/ml < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead) ; 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.
Control Serum Different from expected value	First verify that: 1. the procedure has been correctly performed; 2. no mistake has occurred during its distribution (ex.: dispensation of a wrong sample); 3. the washing procedure and the washer settings are correct; 4. no external contamination of the standard has occurred. 5. the Control Serum has been dissolved with the right volume reported on the label. If a mistake has been pointed out, the assay has to be repeated after eliminating the reason of this error. If no mistake has been found, proceed as follows: a) a value up to +/-20% is obtained: the overall Precision of the laboratory might not enable the test to match the expected value +/-10%. Report the problem to the Supervisor for acceptance or refusal of this result. b) a value higher than +/-20% is obtained: in this case the test is invalid and the DiaPro's customer service has to be called.

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

Important Notes:

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

P. RESULTS

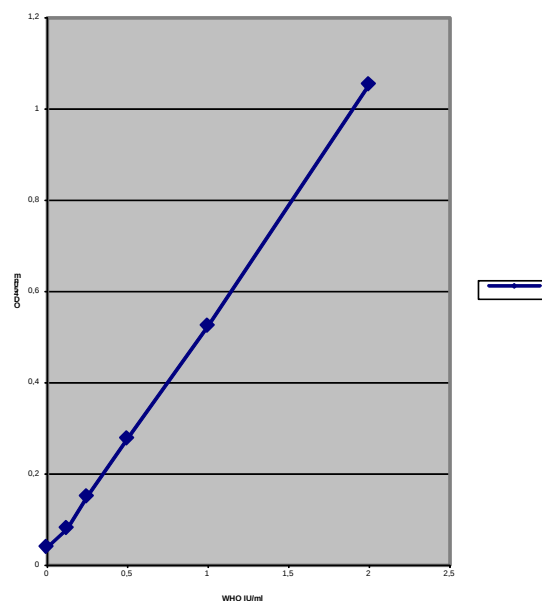
P.1 Quantitative method

If the test turns out to be valid, use for the quantitative method an approved curve fitting program to draw the calibration curve from the values obtained by reading at 450nm/620-630nm (4-parameters interpolation is suggested).

Then on the calibration curve calculate the concentration of anti Cytomegalovirus IgG antibody in samples.

An example of Calibration curve is reported in the next page.

Example of Calibration Curve :



Important Note:

Do not use the calibration curve above to make calculations.

P.2 Qualitative method

In the qualitative method, calculate the mean OD450nm/620-630nm values for the Calibrators 0 and 0.5 IU/ml and then check that the assay is valid.

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

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

Calibrator 0 IU/ml: 0.035 – 0.045 OD450nm
Mean Value: 0.040 OD450nm
Lower than 0.150 – Accepted
Calibrator 0.5 IU/ml: 0.260 – 0.280 OD450nm
Mean Value: 0.270 OD450nm
Higher than Cal 0 + 0.100 – Accepted
Calibrator 8 IU/ml: 2.885 OD450nm
Higher than 1.000 – Accepted

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Samples with a concentration lower than 0.5 WHO IU/ml are considered negative for anti Cytomegalovirus IgG antibody. Samples with a concentration higher than 0.5 WHO IU/ml are considered positive for anti Cytomegalovirus IgG antibody. Particular attention in the interpretation of results has to be used in the follow-up of pregnancy for an infection of Cytomegalovirus due to the risk of severe neonatal malformations.

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
3. In the follow-up of pregnancy for Cytomegalovirus infection a positive result (presence of IgG antibody > 0.5 IU/ml)

should be confirmed to ruled out the risk of a false positive result and a false definition of protection.

R. PERFORMANCES

Evaluation of Performances has been conducted in accordance with the European standard.

1. Limit of detection

The limit of detection of the assay (or analytical sensitivity) has been calculated by means of the 1st proposed international standard produced by the World Health Organization (WHO) for CMV IgG.

The limit of detection has been calculated as mean OD450nm Calibrator 0 WHO IU/ml + 5 SD.

The table below reports the mean OD450nm values of this standard when diluted in negative plasma and then examined in the assay.

Mean OD450nm

WHO IU/ml	CMVG.CE Lot # 0303	CMVG.CE Lot # 0203	CMVG.CE Lot # 0103
2	1.053	1.101	1.098
1	0.524	0.498	0.559
0.5	0.277	0.268	0.271
0.25	0.150	0.169	0.161
0.125	0.080	0.091	0.087
Negative	0.039	0.035	0.040

The assay shows a limit of detection far better than 0.5 WHO IU/ml; however the interpretation of results is maintained at that value in order to safely monitor pregnancy and neonatal risk.

2. Diagnostic sensitivity:

The diagnostic sensitivity has been tested in an external performance evaluation study (University Hospital, Microbiology Department, Salamanca, Spain) on panels of samples classified positive by a kit US FDA approved. Positive samples from different stage of CMV infection were tested.

The value, obtained from the analysis of more than 300 specimens, has been > 98%.

In addition the seroconversion panel PT 901 produced by Boston Biomedical Inc., BBI, USA, has been tested. Results are reported below with reference to an European kit.

BBI Panel PTC 901

Member ID	CMVG.CE OD450nm	S/Co	BioMerieux VIDAS
01	0.071	0.2	Negative
02	0.043	0.1	Negative
03	0.057	0.2	Negative
04	0.046	0.1	Negative
05	0.086	0.3	Negative
06	1.002	3.2	Positive
07	1.442	4.6	Positive
08	1.630	5.2	Positive
09	1.770	5.6	Positive

Note: Cut-Off = 0.5 IU/ml = 0.316

3. Diagnostic specificity:

The diagnostic specificity has been determined in the same centre on panels of negative samples from not infected individuals, classified negative with a kit US FDA approved.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the value of specificity.

Frozen specimens have been tested, as well, to check for interferences due to collection and storage.

No interference was observed.

Potentially interfering samples derived from patients with different pathologies (mostly ANA, AMA and RF positive) and from pregnant women were tested.

No crossreaction was observed.

An overall value > 98% of specificity was found when examined on more than 100 specimens.

4. Precision:

It has been calculated on three samples, a negative, a low positive and a positive, examined in 16 replicates in three separate runs for three lots. Results are reported as follows:

CMVG.CE: lot # 0303

Calibrator 0 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.073	0.073	0.077	0.074
Std.Deviation	0.010	0.010	0.009	0.010
CV %	13.3	14	12	13.1

Calibrator 0.5 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.316	0.292	0.309	0.306
Std.Deviation	0.027	0.015	0.020	0.020
CV %	8.4	5.1	6.3	6.6

Calibrator 8 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	3.262	3.137	3.210	3.203
Std.Deviation	0.126	0.065	0.147	0.113
CV %	3.9	2.1	4.6	3.5

CMVG.CE: lot # 0203

Calibrator 0 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.058	0.060	0.063	0.061
Std.Deviation	0.005	0.005	0.005	0.005
CV %	8.8	7.9	8.6	8.4

Calibrator 0.5 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.299	0.297	0.300	0.299
Std.Deviation	0.012	0.007	0.011	0.010
CV %	3.9	2.5	3.6	3.3

Calibrator 8 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	3.124	3.062	3.094	3.093
Std.Deviation	0.051	0.068	0.057	0.059
CV %	1.6	2.2	1.9	1.9

CMVG.CE: lot # 0103

Calibrator 0 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.064	0.062	0.067	0.064
Std.Deviation	0.005	0.005	0.006	0.005
CV %	7.9	8.3	8.2	8.1

Calibrator 0.5 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.314	0.300	0.296	0.303
Std.Deviation	0.031	0.019	0.012	0.021
CV %	10.0	6.5	4.0	6.8

Calibrator 8 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.729	2.688	2.700	2.705
Std.Deviation	0.109	0.067	0.109	0.095
CV %	4.0	2.5	4.0	3.5

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

5. Accuracy

The assay accuracy has been checked by the dilution and recovery tests. Any "hook effect", underestimation likely to happen at high doses of analyte, was ruled.

Important note:

The performance data have been obtained proceeding as the reading step described in the section M, point 11.

S. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or heat inactivation of the specimen may affect the absorbance values of the samples with consequent alteration of the level of the analyte.

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates after thawing may generate some false results.

This test is suitable only for testing single samples and not pooled ones.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. The patient's clinical history, symptomatology, as well as other diagnostic data should be considered.

REFERENCES

- Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunochimistry 8: 871-874, 1971
- Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol.. 109: 129-135, 1971
- Remington J.S. and Klein J.O.. (1996) In "Infectious diseases of fetus and newborn infant". Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
- Volk W.A. (1982) In "essential of Medical Microbiology". 2nd ed., pp 729, G.B. Lippincott Co. Philadelphia, New York, S.Josè, Toronto.
- Leinikki P.O. et al.. J.Clin.Microbiol.. 8:418, 1978
- Piroid E. et al.. Révue Méd.Vet.. 131:25, 1980.
- Vaheri A. et al.. J.Med.Virol.. 5:171, 1980.
- Vejtorp M. et al.. Acta Path.Microbiol.Scand.. 88:349, 1980.
- Voller A. et al.. Brit.J.Exp.Pathol.. 56:338, 1975

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:

Dia.Pro. Diagnostic Bioprobes Srl.
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) - Italy



0318

CMV IgG

**Ensayo inmunoenzimático para la
determinación cualitativa/cuantitativa de
anticuerpos IgG frente a Citomegalovirus
en plasma y suero humano**

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro"



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

Code: CMVG.CE
96 pruebas

CMV IgG

A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa/cuantitativa de anticuerpos IgG frente a Citomegalovirus, en plasma y suero humano. Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN.

Citomegalovirus (CMV) es un patógeno humano ubicuo, que afecta prevalentemente a niños y adultos jóvenes. Las infecciones por CMV representan aún un importante problema de salud en determinados grupos de pacientes (recién nacidos, receptores de órganos o médula ósea y pacientes con SIDA), en los cuales constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad.

La detección de anticuerpos específicos IgG e IgM contra el virus, representa una herramienta importante en el diagnóstico de las infecciones agudas/primarias, en la reactivación de la infección latente, así como en ausencia de síntomas clínicos típicos. Las infecciones asintomáticas por CMV usualmente se presentan en individuos aparentemente sanos, durante el embarazo o durante algunas enfermedades donde aparece el virus como agente coinfectante.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

Los pocillos de la placa están recubiertos con antígenos nativos de Citomegalovirus, purificados por gradiente de centrifugación con sacarosa e inactivados.

Se añade la muestra diluida, y los anticuerpos IgG contra CMV presentes en la misma son capturados por los antígenos de la fase sólida.

Después del lavado, en la 2ª incubación, los anticuerpos IgG anti Citomegalovirus son detectados mediante anticuerpos policlonales específicos anti-IgG humanos, conjugados con Peroxidasa (HRP).

El enzima capturado en la fase sólida, combinado con la mezcla sustrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG anti-CMV presentes en la muestra. Posteriormente, con la ayuda de una Curva de Calibración contra el primer estándar internacional O.M.S., es posible determinar cuantitativamente los anticuerpos IgG contenidos en la muestra.

D. COMPONENTES

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLATE

12 tiras de 8 pocillos recubiertos con Citomegalovirus, altamente purificado e inactivado por radiaciones UV en presencia de proteínas del suero bovino.

Las placas están almacenadas en bolsas selladas con desecante. Se deben poner las mismas a temperatura ambiente antes de abrirlas, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y conservar a 2-8°C.

2. Curva de Calibración: CAL N° ...

Listo para el uso y curva con código estándar de color, elaborada a partir de plasma humano positivo a IgG-CMV, titulado según estándar de O.M.S (propuesta Estándar International) con rangos:

4ml CAL 1 = 0 OMS IU/ml
4ml CAL 2 = 0,5 OMS IU/ml
2ml CAL 3 = 1 OMS IU/ml
2ml CAL 4 = 2 OMS IU/ml

2ml CAL 5 = 4 OMS IU/ml

4ml CAL 6 = 8 OMS IU/ml.

Los estándares han sido calibrados contra el estándar internacional propuesto por O.M.S. para IgG anti-CMV (referencia: BS/95.1814).

Contiene proteínas séricas humanas, caseína al 2%, tampón Tris-citrato 10 mM pH 7.4+/-0.1, 0.1% de Tween 20, así como azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes. Los estándares son de color azul.

3. Suero Control: CONTROL ...ml

1 vial. Liofilizado.

Contiene proteínas del suero bovino fetal, anticuerpos humanos IgG anti-CMV a una concentración aproximada de 2 ±10% mlIU/ml (O.M.S.), además de sulfato de gentamicina 0.2 mg/ml y ProClin 300 0.045% como conservantes.

Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del frasco varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen indicado en la etiqueta.

4. Tampón de Lavado Concentrado: WASHBUF 20X

1x60ml/botella. Solución concentrada 20x.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, Tween 20 al 0.05% y ProClin 300 al 0.045%.

5. Conjugado: CONJ

2x8ml/vial. Solución lista para el uso. Codificado con el color rojo. Contiene anticuerpos policlonales anti-IgG humana conjugados con Peroxidasa (HRP), BSA 5%, tampón Tris 10 mM pH 6.8+/-0.1, además de sulfato de gentamicina 0.02% y ProClin 300 0.045% como conservantes.

6. Cromógeno/Substrato: SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato-fosfato 50 mM pH 3.5-3.8, dimetilsulfóxido 4%, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02%.

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

7. Ácido Sulfúrico: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0.3M

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

8. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60ml/vial. Contiene 2% de caseína, tampón Tris-citrato 10 mM pH 6.0 +/-0.1, 0.1% de Tween 20, azida sódica al 0.09% y ProClin 300 al 0.045% como conservantes. El reactivo está codificado con el color azul.

9. Sellador adhesivo, n° 2

10. Manual de instrucciones, n° 1

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

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

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El equipo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar los indumentos protectores adecuados de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los equipos, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del sustrato a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar reactivos de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos.
7. Comprobar que los reactivos no contengan precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el producto después de la fecha de vencimiento indicada en el equipo e internamente en los reactivos. Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en equipos abiertos, en uso por un período de hasta 3 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infectivas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.
13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales

de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados.
3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.
6. Aquellas muestras, cuya concentración de IgG anti-CMV se sospeche mayor de 8 IU/ml, deben diluirse a 1:10 o 1:100 antes del uso, con ayuda del Calibrador 0 IU/ml. Las diluciones deben efectuarse en tubos limpios desechables añadiendo 50 µl de la muestra y 450 µl del Cal 0 (1:10), después 50 µl de la dilución 1:10 y 450 µl del Cal 0 (1:100). Se deben mezclar los tubos en el vortex y después proseguir con los pasos indicados en la sección M.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en equipos abiertos, en uso por un período de hasta 3 meses.

Microplaca:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación. De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas, deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes, se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie de amarillo a verde.

Curva de Calibración:

Listo para el uso. Mezclar bien con la ayuda de un vortex, antes de usar.

Suero Control:

Añadir al polvo liofilizado el volumen de agua de calidad ELISA indicado en la etiqueta. Dejar disolver totalmente y mezclar delicadamente en el vortex.

Nota: Una vez reconstituida, la solución no es estable. Se recomienda mantenerla congelada en alícuotas a -20°C.

Solución de Lavado Concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada y mezclarse delicadamente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

Conjugado:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Cromógeno/ Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Diluyente de muestras:

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

Ácido Sulfúrico:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Leyenda:

Indicación de peligro, Frases H

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, Frases P

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

1. Las micropipetas deben ser calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (etanol 70%, lejía 10%, de calidad de los desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%.
2. La incubadora de ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar

que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.

4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de ±5%.
5. El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y, de un segundo filtro de 620-630nm, obligatorio para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda ≤ 10 b) Rango de absorbancia de 0 a ≥2.0, c) Linealidad ≥2.0, reproducibilidad ≥1%. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar la correcta medida de la densidad óptica, según las normas del fabricante.
6. En caso de usar un sistema automatizado de ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en las secciones "Control interno de calidad" y "Procedimiento del ensayo". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y las de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos por contaminación de los pocillos adyacentes por muestras fuertemente reactivas. Se recomienda el uso de sistemas automatizados para el pesquaje en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.
7. El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

1. Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del equipo (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Compruebe que los componentes líquidos no sean contaminados con partículas o agregados visibles.
3. Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico.
4. Compruebe que no han ocurrido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
5. Disolver el Suero Control liofilizado, como se ha descrito anteriormente.
6. Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
7. Dejar los componentes restantes hasta alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar después suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
8. Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y alimentas el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las

instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.

9. Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
10. En caso de trabajar automáticamente, encender el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
11. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
12. Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
13. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

El equipo puede usarse tanto para la determinación cuantitativa como cualitativa.

M1. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA:

Ensayos Automatizados.

En caso de que el ensayo se realice de manera automatizada con un sistema ELISA, se recomienda programar el equipo para aspirar 1000 µl de Diluyente de Muestras, y posteriormente 10 µl de muestra (factor de dilución 1:101).

La mezcla debe ser dispensada cuidadosamente en un tubo de dilución. Antes de aspirar la muestra siguiente, las agujas deben lavarse debidamente para evitar cualquier contaminación cruzada entre las muestras. Una vez diluidas todas las muestras, programar el equipo para dispensar 100 µl de cada muestra en los pocillos correspondientes.

Este procedimiento puede realizarse además en dos pasos de dilución 1:10 (90 µl Diluyente de Muestras + 10 µl Muestra) en una segunda plataforma de dilución. Después, se recomienda programar el equipo para aspirar 100 µl de Diluyente de Muestras y 10 µl de la primera dilución en la plataforma, posteriormente dispensar el contenido total en los pocillos correspondientes.

No es necesario diluir el Calibrador ni el Suero Control (ya diluido) pues están listos para el uso.

Dispensar 100 µl de controles/calibradores en los pocillos correspondientes.

Para las operaciones siguientes, consulte las instrucciones que aparecen a continuación para el Ensayo Manual.

Es muy importante comprobar que el tiempo entre el dispensado de la primera y la última muestra sea calculado por el instrumento y considerado para los lavados.

Ensayo Manual.

1. Diluir las muestras 1:101 en un tubo de dilución apropiado (ejemplo: 1000 de Diluyente de Muestras+10 µl de muestra). No diluir el Panel de Calibración, ya que los calibradores están listos para el uso. Mezclar cuidadosamente, con ayuda de un vórtex, todos los componentes líquidos y continuar como se describe a continuación.
2. Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico. Dejar vacíos los pocillos A1 y B1 para el blanco.
3. Dispensar 100 µl de Calibradores y 100 µl de Suero Control, por duplicado, después dispensar 100 µl de cada muestra diluida en su pocillo correspondiente.
4. Incubar la microplaca **60 min a +37°C**.

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

5. Lavar la microplaca con el lavador automático dispensando y aspirando según se indica (sección I.3).

6. Dispensar 100 µl del Conjugado en todos los pocillos, excepto en A1 y B1, después cubrir con el sellador. Compruebe que este reactivo de color rojo ha sido añadido en todos los pocillos excepto A1 y B1.

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

7. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.
8. Lavar los pocillos de igual forma que en el paso 5.
9. Dispensar 100 µl de TMB/H₂O₂ en todos los pocillos, incluidos los del blanco. Controlar que los reactivos han sido correctamente añadidos. Incubar la microplaca por **20 minutos a temperatura ambiente (18-24°C)**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

10. Dispensar 100 µl de Ácido Sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 9. La adición del ácido cambia el color de los calibradores positivos, el suero control y las muestras positivas de azul a amarillo.
11. Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con los pocillos A1 y B1 (blanco).

M2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA:

Si se requiere solamente un análisis cualitativo, proceda como se indica a continuación.

Ensayo automatizado:

Proceder según la sección M1.

Ensayo Manual.

1. Diluir las muestras 1:101 en un tubo de dilución apropiado (ejemplo: 1000 de Diluyente de Muestras+10 µl de muestra). No diluir el Panel de Calibración, ya que los calibradores están listos para el uso. Mezclar cuidadosamente, con ayuda de un vórtex, todos los componentes líquidos y continuar como se describe a continuación.
2. Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico. Dejar vacío el pocillo A1 para el blanco.
3. Dispensar 100 µl del Calibrador 0 IU/ml y 100 µl del Calibrador 0.5 IU/ml por duplicado, y 100 µl del Calibrador 8 IU/ml sencillo. Después dispensar 100 µl de cada muestra diluida en su pocillo correspondiente.
4. Incubar la microplaca **60 min a +37°C**.

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

5. Lavar la microplaca con el lavador automático dispensando y aspirando según se indica (sección I.3).
6. Dispensar 100 µl del Conjugado en todos los pocillos, excepto en A1, después cubrir con el sellador. Compruebe que este reactivo de color rojo ha sido añadido en todos los pocillos excepto A1.

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

7. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.
8. Lavar los pocillos de igual forma que en el paso 5.
9. Dispensar 100 µl de TMB/H₂O₂ en todos los pocillos, incluido el del blanco. Controlar que los reactivos han sido correctamente añadidos. Incubar la microplaca por **20 minutos a temperatura ambiente (18-24°C)**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

10. Dispensar 100µl de Ácido Sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 9. La adición del ácido cambia el color de los calibradores positivos, el suero control y las muestras positivas de azul a amarillo.
11. Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y, otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

Notas generales importantes:

1. Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de stop y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.
3. El suero de control (CS) no afecta al cálculo de los resultados de la prueba. El suero de control (CS) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO.

Método	Operaciones
Calibradores & Control	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado	100 µl
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3ª incubación	20 min
Temperatura	t.a.*
Ácido Sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450nm / 620-630nm

t.a.*temperatura ambiente

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado en el análisis cuantitativo:

Microplaca												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	CAL4	M 1									
B	BL	CAL4	M 2									
C	CAL1	CAL5	M 3									
D	CAL1	CAL5	M 4									
E	CAL2	CAL6	M 5									
F	CAL2	CAL6	M 6									
G	CAL3	SC	M 7									
H	CAL3	SC	M 8									

Leyenda: BL = Blanco // CAL = Calibradores // M = Muestra // SC = Suero Control

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado en el análisis cualitativo:

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

Leyenda: BL = Blanco // CAL = Calibradores // M = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza un grupo de pruebas de validación con los controles cada vez que se usa el equipo para verificar si el funcionamiento del ensayo es correcto, según las directivas IVDD 98/79/EC.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros :

Parámetro	Exigencia
Pocillo Blanco	< 0.100 DO450nm
Calibrador 0 IU/ml (CAL1)	< 0.150 valor medio DO450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación < 30%
Calibrador 0.5IU/ml	DO450nm > DO450nm CAL1 + 0.100
Calibrador 8 IU/ml	DO450nm > 1.000
Suero Control	2 OMS IU/ml +/-10%

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

En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe:

Problema	Compruebe que
Pocillo blanco > 0.100 DO450nm	la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
Calibrador 0 IU/ml > 0.150 DO450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación > 30%	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido alimentado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensado de un calibrador positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del Cal negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.

Calibrador 0.5 IU/ml DO450nm < DO450nm CAL1 + 0.100	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el calibrador equivocado). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
Calibrador 8 IU/ml < 1.000 DO450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el calibrador equivocado). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
Suero Control Valor distinto al esperado	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar una muestra equivocada). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador son correctos. 4. no ha ocurrido contaminación externa de los controles. 5. el Suero Control ha sido disuelto con el volumen correcto indicado en la etiqueta Si se indica un error, el ensayo debe repetirse tras eliminar la causa del mismo. En caso de no encontrar un error, procédase como sigue: a) si se obtiene un valor hasta +/-20%: la precisión global del laboratorio podría no permitir alcanzar +/-10% del valor esperado. Comunicar el problema al responsable para aceptar ó rechazar este resultado. b) si se obtiene un valor superior a +/-20%: en este caso el test es inválido y hay que avisar al servicio de atención al cliente de DiaPro

De presentarse alguno de los problemas anteriores, después de comprobar, avisar al responsable para tomar las medidas pertinentes.

Nota importante:

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

P. RESULTADOS.

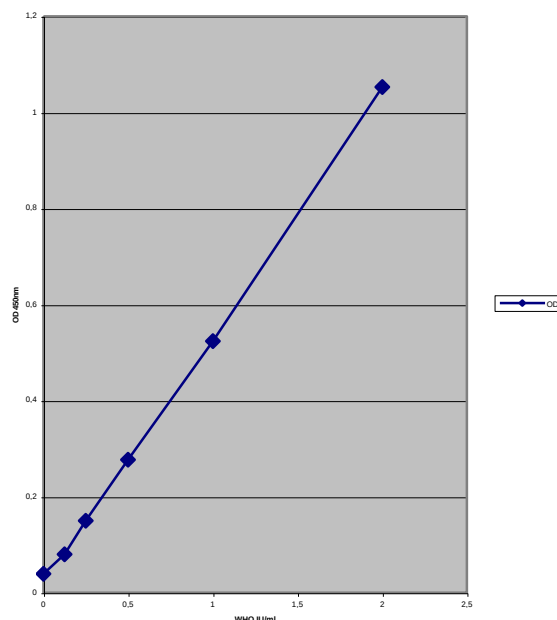
P.1 Método cuantitativo.

Si el ensayo resulta válido, usar para el método cuantitativo un sistema de ajuste de curva para diseñar la curva de calibración con los valores obtenidos en la lectura a 450nm/620-630nm (se sugiere interpolar 4 parámetros).

Posteriormente, calcular sobre la curva de calibración la concentración de anticuerpos IgG contra CMV presentes en la muestra.

A continuación, un ejemplo de curva de calibración:

Curva de calibración.



Nota Importante:

No usar la curva anterior para formular los cálculos.

P.2 Método cualitativo.

En el método cualitativo, calcular los valores medios de DO450nm/620-630nm para los Calibradores 0 y 0,5 IU/ml, después comprobar que el ensayo es válido.

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

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

Calibrador 0 IU/ml: 0.035 – 0.045 DO450nm
Valor medio : 0.040 DO450nm
Menor de 0.150 – Válido
Calibrador 0.5 IU/ml: 0.260 – 0.280 DO450nm
Valor medio : 0.270 DO450nm
Mayor que Cal 0 + 0.100 – Válido
Calibrador 8 IU/ml: 2.885 DO450nm
Mayor que 1.000 – Válido

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Las muestras con una concentración menor de 0.5 OMS IU/ml se consideran negativas a anticuerpos IgG anti-CMV. Las muestras con una concentración mayor a 0.5 OMS IU/ml se consideran positivas a anticuerpos IgG anti-CMV. Debe ponerse particular atención a la interpretación de los resultados en el seguimiento del embarazo, ya que la infección por Citomegalovirus puede provocar malformaciones en el neonato.

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.

2. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
3. En el monitoreo de infección por CMV durante el embarazo, un resultado positivo (presencia de anticuerpos IgG > 0.5 IU/ml) debe ser confirmado para eliminar cualquier riesgo de falso positivo o falsa definición de protección.

R. FUNCIONAMIENTO.

La evaluación del funcionamiento ha sido realizada según el Estándar Europeo.

1. Límite de detección.

El límite de detección del ensayo (o sensibilidad analítica) ha sido calculado por medio del primer estándar internacional propuesto para CMV IgG y producido por la Organización Mundial de la Salud (O.M.S).

El límite de detección ha sido calculado como valor medio de DO450nm del Calibrador 0 OMS U/ml + 5 SD.

La siguiente tabla muestra los valores medios de DO450nm del estándar, diluido en plasma negativo y examinado en el ensayo.

Valores medios de DO450nm			
OMS IU/ml	CMVG.CE Lote # 0303	CMVG.CE Lote # 0203	CMVG.CE Lote # 0103
2	1.053	1.101	1.098
1	0.524	0.498	0.559
0.5	0.277	0.268	0.271
0.25	0.150	0.169	0.161
0.125	0.080	0.091	0.087
Negativo	0.039	0.035	0.040

El ensayo demuestra un límite de detección superior a 0,5 OMS IU/ml, sin embargo la interpretación de los resultados se ha mantenido en ese valor para monitorear el embarazo y el riesgo neonatal en manera más eficiente.

2. Sensibilidad Diagnóstica.

La sensibilidad diagnóstica se ha estudiado en un ensayo clínico externo (Departamento de Microbiología del Hospital Universitario de Salamanca, España) utilizando paneles de muestras, clasificadas como positivas mediante un equipo de referencia US FDA. Se probaron muestras positivas correspondientes a diferentes etapas de la infección por CMV. El valor obtenido del análisis de más de 300 muestras fue > 98%.

Se probó además el panel de seroconversión PT 901, producido por Boston Biomedical Inc., BBI, Estados Unidos. Los resultados se muestran a continuación en referencia con un equipo europeo.

BBI Panel PTC 901			
Miembro ID	CMVG.CE DO450nm	M/Co	BioMerieux VIDAS
01	0.071	0.2	Negativo
02	0.043	0.1	Negativo
03	0.057	0.2	Negativo
04	0.046	0.1	Negativo
05	0.086	0.3	Negativo
06	1.002	3.2	Positivo
07	1.442	4.6	Positivo
08	1.630	5.2	Positivo
09	1.770	5.6	Positivo

Nota: Valor de Corte = 0.5 IU/ml = 0.316

3. Especificidad Diagnóstica.

La especificidad diagnóstica ha sido determinada en el mismo centro, utilizando paneles de muestras provenientes de individuos sanos, clasificadas como negativas mediante un equipo de referencia US FDA.

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

Las muestras congeladas han sido analizadas para comprobar si la colección y la conservación interfiere con el procedimiento del ensayo. No se ha observado interferencia a partir de muestras limpias y libres de agregados.

Se analizaron muestras de potencial interferencia derivadas de pacientes con diversas patologías (mayormente positivos a ANA, AMA y RF) y de mujeres embarazadas. No se observaron reacciones cruzadas.

Se obtuvo un valor de especificidad total > 98% al examinar más de 100 muestras.

4. Precisión:

Ha sido calculada a partir de tres muestras : una negativa, una débil positiva y una positiva, examinadas en 16 réplicas en tres corridas separadas, para 3 lotes. Los resultados son los siguientes:

CMVG.CE: lote # 0303

Calibrador 0 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor promedio
DO 450nm	0.073	0.073	0.077	0.074
SD	0.010	0.010	0.009	0.010
CV %	13.3	14	12	13.1

Calibrador 0.5 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor promedio
DO 450nm	0.316	0.292	0.309	0.306
SD	0.027	0.015	0.020	0.020
CV %	8.4	5.1	6.3	6.6

Calibrador 8 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor promedio
DO 450nm	3.262	3.137	3.210	3.203
SD	0.126	0.065	0.147	0.113
CV %	3.9	2.1	4.6	3.5

CMVG.CE: lote # 0203

Calibrador 0 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor promedio
DO 450nm	0.058	0.060	0.063	0.061
SD	0.005	0.005	0.005	0.005
CV %	8.8	7.9	8.6	8.4

Calibrador 0.5 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor promedio
DO 450nm	0.299	0.297	0.300	0.299
SD	0.012	0.007	0.011	0.010
CV %	3.9	2.5	3.6	3.3

Calibrador 8 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor promedio
DO 450nm	3.124	3.062	3.094	3.093
SD	0.051	0.068	0.057	0.059
CV %	1.6	2.2	1.9	1.9

CMVG.CE: lote # 0103

Calibrador 0 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor promedio
DO 450nm	0.064	0.062	0.067	0.064
DS	0.005	0.005	0.006	0.005
CV %	7.9	8.3	8.2	8.1

Calibrador 0.5 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor promedio
DO 450nm	0.314	0.300	0.296	0.303
SD	0.031	0.019	0.012	0.021
CV %	10.0	6.5	4.0	6.8

Calibrador 8 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor promedio
DO 450nm	2.729	2.688	2.700	2.705
SD	0.109	0.067	0.109	0.095
CV %	4.0	2.5	4.0	3.5

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

5. Exactitud.

La exactitud del ensayo ha sido comprobada mediante la dilución y las pruebas de recuperación. Se tuvo en cuenta la posibilidad de ocurrencia del "efecto gancho", donde se subestiman los valores a dosis elevadas del analito.

S. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

La contaminación bacterica o la inactivación por calor de la muestra pueden afectar los valores de DO y por tanto alterar los niveles del analita.

Las muestras que después de ser descongeladas presentan partículas de fibrina o partículas agregadas, generan algunos resultados falsos positivos.

El ensayo es útil solo para probar muestras independientes y no mezclas.

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no debe establecerse en base a un solo resultado, sino que deben tenerse en consideración la historia clínica del paciente, la sintomatología, así como otros datos diagnósticos.

Nota importante:

Los datos de rendimiento se obtuvieron siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunochemistry 8: 871-874, 1971
2. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol.. 109: 129-135, 1971
3. Remington J.S. and Klein J.O.. (1996) In "Infectious diseases of fetus and newborn infant". Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
4. Volk W.A. (1982) In "essential of Medical Microbiology". 2nd ed., pp 729, G.B. Lippincott Co. Philadelphia, New York, S.José, Toronto.
5. Leinikki P.O. et al.. J.Clin.Microbiol.. 8:418, 1978
6. Piroid E. et al.. Révue Méd.Vet.. 131:25, 1980.
7. Vaheri A. et al.. J.Med.Virol.. 5:171, 1980.
8. Vejtorp M. et al.. Acta Path.Microbiol.Scand.. 88:349, 1980.
9. Voller A. et al.. Brit.J.Exp.Pathol.. 56:338, 1975

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el marcado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:

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



0318

CMV IgM

**“Capture” Enzyme Immuno Assay
(ELISA) for the determination of IgM
antibodies to Cytomegalovirus
in human plasma and sera**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
Milano - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

CMV IgM

A. INTENDED USE

Enzyme Immuno Assay (ELISA) for the determination of IgM class antibodies to Cytomegalovirus or CMV in human plasma and sera with the "capture" system.
The kit is intended for the follow-up of CMV infected patients and the monitoring of the risk of neonatal defects due to CMV infection during pregnancy.
For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

Cytomegalovirus or CMV is an ubiquitous human pathogen, whose infection is particular prevalent among children and young adults. Infections by CMV continue to be an important health problem in certain patient populations, such as newborns, graft recipients of solid organs or bone marrow and AIDS patients. In these groups CMV is a major cause of morbidity and mortality.

The detection of virus-specific IgG and IgM antibodies is of great value in the diagnosis of acute/primary virus infections or reactivation of a latent one, in the absence of typical clinical symptoms.

Asymptomatic infections usually happen for CMV in apparently healthy individuals, during pregnancy and several diseases as a co-infective agent.

Recently developed IgM capture ELISA's for CMV of new generation, taking advantage of CMV specific synthetic antigens, provide the clinician with a powerful and reliable diagnostic test, not affected by rheumatoid factor, for the monitoring of "risk" population.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

The assay is based on the principle of "IgM capture" where IgM class antibodies in the sample are first captured by the solid phase coated with anti hIgM antibody.

After washing out all the other components of the sample and in particular IgG antibodies, in the 2nd incubation bound anti CMV IgM are detected by the addition of a complex composed of biotinylated CMV antigens and Streptavidine, labeled with peroxidase (HRP).

After incubation, microwells are washed to remove unbound conjugate and then the chromogen/substrate is added.

In the presence of bound conjugate the colorless substrate is hydrolyzed to a colored end-product, whose optical density may be detected and is proportional to the amount of IgM antibodies to Cytomegalovirus present in the sample.

A system is described how to control whether the positivity shown by a sample is true or not (Confirmation Test), helpful for the clinician to make a correct interpretation of results.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to carry out 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 microwells coated with an affinity purified antibody mono specific to human IgM, in presence of bovine proteins. Plates are sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 2..8°C.

2. Negative Control: CONTROL

1x4.0 ml/vial. Ready to use control. It contains 1% human plasma negative for CMV IgM, 2% casein, 10 mM Tris-citrate

buffer pH 6.0+/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% sodium azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.
The negative control is colorless.

3. Positive Control: CONTROL+

1x4.0 ml/vial. Ready to use control. It contains 1% human plasma positive for CMV IgM, 2% casein, 10 mM Tris-citrate buffer pH 6.0+/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% sodium azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.
Code colored with 0.01% green alimentary dye

4. Calibrator: CAL ...ml

N° 1 lyophilized vial. To be dissolved with EIA grade water as reported in the label. It contains anti CMV IgM positive human plasma calibrated on BBI Accurun # 146, fetal bovine serum, 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

Note: The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label.

5. Lyophilized CMV Ag: AG CMV

N° 6 lyophilized vials. The vials contain lyophilized CMV reacting antigens biotinylated. The solution contains 2% bovine proteins, 10 mM Tris HCl buffer pH 6.8+/-0.1, 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300.

To be dissolved with 1.9 ml of Antigen Diluent as reported in the specific section.

6. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle. 20x concentrated solution.

Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

7. Enzyme conjugate: CONJ 20X

1x0.8 ml/vial. 20x concentrated solution of Streptavidine, labeled with HRP and diluted in a protein buffer containing 10 mM Tris HCl buffer pH 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.2 mg/ml gentamicine sulphate as preservatives.

8. Antigen Diluent : AG DIL

n° 1 vial of 16 ml. Protein buffer solution for the preparation of the Immunocomplex. The solution contains 10 mM Tris HCl buffer pH 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.2 mg/ml gentamicine sulphate as preservatives. The reagent is code colored with 0.01% red alimentary dye.

9. Specimen Diluent : DILSPE

2x60.0 ml/vial. Proteic buffered solution for the dilution of samples. It contains 2% casein, 10 mM Tris-citrate buffer pH 6.0+/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% sodium azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

The reagent is color coded with 0.01% blue alimentary dye.

10. Chromogen/Substrate : SUBS TMB

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

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

11. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vial. It contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

12. Plate sealing foils n° 2

13. Package insert n° 1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
5. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
10. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit did not pointed out any relevant loss of activity up to six 6 uses of the device and up to 3 months.
11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are

treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..

14. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.

15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water

16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.
4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-uses of the device and up to 3 months.

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant has not turned dark green, indicating a defect in manufacturing. In this case, call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back into the aluminum pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°..8°C.

After first opening, remaining strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

Negative Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Positive Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Calibrator:

Add the volume of ELISA grade water reported on the label to the lyophilized powder. Let fully dissolve and then gently mix on vortex.

Important Note: The solution is not stable. Store the Calibrator frozen in aliquots at -20°C.

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before

use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

Antigen/Conjugate Complex:

Proceed carefully as follows:

1. Dissolve the content of a lyophilized vial with 1.9 ml of Antigen Diluent. Let fully dissolved the lyophilized content and then gently mix on vortex.
2. Gently mix the concentrated Enzyme Conjugate on vortex. Then add 0.1 ml of it to the vial of the dissolved Cytomegalovirus Ag and mix gently on vortex.

Important Notes:

1. Dissolve and prepare only the number of vials necessary to the test. The Immunocomplex obtained is not stable. Store any residual solution frozen in aliquots at -20°C.
2. The preparation of the Immunocomplex has to be done **right before** the dispensation of samples and controls into the plate. Mix again on vortex gently just before its use.

Specimen Diluent:

Ready to use. Mix well on vortex before use

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.

2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/-0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.

3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution.

The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).

5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.

An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.

4. Incubation times have a tolerance of ±5%.

5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0; (c) linearity to ≥ 2.0; repeatability ≥ 1%. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.

6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Validation of Test" and "Assay Performances". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.

7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use the device if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates. Check that the Chromogen/Substrate is colorless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
4. Dissolve the Calibrator as described above and gently mix.

- Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
- Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
- Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
- If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
- Check that the micropipettes are set to the required volume.
- Check that all the other equipment is available and ready to use.
- In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.
- Wash the microplate with an automatic washer by delivering and aspirating as reported previously (section I.3).
- Pipette 100 µl Antigen/Conjugate Complex into each well, except the blanking well A1, and cover with the sealer. Check that all wells are red colored, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Ag/Ab immunocomplex

- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
- Wash microwells as in step 6.
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

M. ASSAY PROCEDURE

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

M.1 Automated assay:

In case the test is carried out automatically with an ELISA system, we suggest to make the instrument aspirate 1000 µl Specimen Diluent and then 10 µl sample (1:101 dilution factor). The whole content is then dispensed into a properly defined dilution tube. Before the next sample is aspirated, needles have to be duly washed to avoid any cross-contamination among samples. When all the samples have been diluted make the instrument dispense 100 µl diluted samples into the proper wells of the microplate.

This procedure may be carried out also in two steps of dilutions of 1:10 each (90 µl Specimen Diluent + 10 µl sample) into a second dilution platform. Make then the instrument aspirate first 100 µl Specimen Diluent, then 10 µl liquid from the first dilution in the platform and finally dispense the whole content in the proper well of the assay microplate.

Do not dilute controls/calibrator as they are ready to use.

Dispense 100 µl calibrators/control in the appropriate calibration/control wells.

For the next operations follow the operative instructions reported below for the Manual Assay.

It is strongly recommended to check that the time lap between the dispensation of the first and the last sample will be calculated by the instrument and taken into consideration by delaying the first washing operation accordingly.

M. 2 Manual assay:

- Dilute samples 1:101 by dispensing first 10 µl sample and then 1 ml Specimen Diluent into a dilution tube; mix gently on vortex.
- Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the well in position A1 empty for the operation of blanking.
- Dispense 100 µl of Negative Control and 100 µl of Calibrator in the proper wells in duplicate. Dispense 100 µl of Positive Control in single into the proper well. Do not dilute controls and the calibrator as they are ready to use !
- Dispense 100 µl diluted samples in the proper sample wells and then check that all the samples wells are blue colored and that controls and calibrator have been dispensed.
- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 10. Addition of acid will turn the positive control and positive samples from blue to yellow.
- Measure the color intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

Important notes:

- Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.
- Reading has to be carried out just after the addition of the Stop Solution and anyway not any longer than 20 minutes after its addition. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to high background.
- The Calibrator (CAL) does not affect the cut-off calculation and therefore the test results calculation. The Calibrator may be used only when a laboratory internal quality control is required by the management.

N. ASSAY SCHEME

Controls&calibrator	100 ul
Samples diluted 1:101	100 ul
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Washing	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Immunocomplex	100 ul
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Washing	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H2O2 mix	100 ul
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm / 620-630nm

An example of dispensation scheme is reported below:

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

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

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as qualified.

Control that the following data are matched:

Parameter	Requirements
Blank well	< 0.05 OD450nm value
Negative Control mean value (NC)	< 0.150 OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
Calibrator	S/Co > 0.75
Positive Control	> 0.750 OD450nm

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

If they do not, do not proceed any further and perform the following checks:

Problem	Check
Blank well > 0.050 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not become contaminated during the assay
Negative Control (NC) > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of negative control); 4. that no contamination of the negative control or of the wells where the control was dispensed has occurred due to positive samples, to spills or to the enzyme conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

Calibrator S/Co < 0.75	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution (ex.: dispensation of negative control instead) 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
Positive Control < 0.750 OD450nm	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during the distribution of the control (dispensation of negative control instead of positive control). 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

If any of the above problems have occurred, report the problem to the supervisor for further actions.

Important Note:

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 12.

P. CALCULATION OF THE CUT-OFF

The test results are calculated by means of the mean OD450nm/620-630nm value of the Negative Control (NC) and a mathematical calculation, in order to define the following cut-off formulation:

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

The value found for the test is used for the interpretation of results as described in the next paragraph.

Important note: When the calculation of results is performed by the operating system of an ELISA automated work station, ensure that the proper formulation is used to calculate the cut-off value and generate the correct interpretation of results.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

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

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

A negative result indicates that the patient is not undergoing an acute infection of Cytomegalovirus.

Any patient showing an equivocal result, should be re-tested by examining a second sample taken from the patient after 1-2 weeks from first testing.

A positive result is indicative of a CMV infection.

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 12).

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

Negative Control: 0.050 – 0.060 – 0.070 OD450nm
Mean Value: 0.060 OD450nm
Lower than 0.150 – Accepted

Positive Control: 1.850 OD450nm
Higher than 0.750 – Accepted

Cut-Off = 0.060+0.250 = 0.310

Calibrator: 0.550 - 0.530 OD450nm
Mean value: 0.540 OD450nm S/Co = 1.7
S/Co higher than 0.75 – Accepted

Sample 1: 0.070 OD450nm
Sample 2: 1.690 OD450nm
Sample 1 S/Co < 1 = negative
Sample 2 S/Co > 1.2 = positive

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. Particular attention in the interpretation of results has to be used in the follow-up of pregnancy for an infection of Cytomegalovirus due to the risk of severe neonatal malformations.
3. Any positive sample should be submitted to the Confirmation Test reported in section T before giving a result of positivity. By carrying out this test, false reactions, leading to a misinterpretation of the analytical result, can be revealed and then ruled out.
4. In pregnancy monitoring, it is strongly recommended that any positive result is confirmed first with the procedure described below and secondly with a different device for Cytomegalovirus IgM detection, before taking any preventive medical action.
5. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
6. Diagnosis of infection has to be taken and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Limit of detection

In absence of an international standard, Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. has defined an internal gold Standard, prepared from a sample positive for CMV IgM. The dilution curves prepared with this material of reference are reported below:

OD450nm values

IGS dilution	CMVM.CE Lot # 0703	CMVM.CE Lot # 0603	CMVM.CE Lot # 0403
3X	1.262	1.155	1.109
6X	0.593	0.642	0.570
12X	0.210	0.277	0.225
24X	0.100	0.115	0.110
negative	0.015	0.029	0.030

In addition the preparation code Accurun n° 146, prepared by Boston Biomedica Inc., USA, for CMV IgM testing, was also used to generate limiting dilution curves, prepared as described above and reported in the next table

OD450nm values

Accurun # 146	CMVM.CE Lot # 0703	CMVM.CE Lot # 0603	CMVM.CE Lot # 0403
1X	0.653	0.596	0.603
2X	0.339	0.312	0.301
4X	0.165	0.159	0.148
8X	0.070	0.075	0.069
16X	0.020	0.031	0.027
Negative	0.013	0.015	0.012

2. Diagnostic sensitivity:

The diagnostic sensitivity has been tested on panels of samples classified positive by a US FDA approved kit.

Positive samples were collected from patients carrying Cytomegalovirus infection, confirmed by clinical symptoms and analysis.

An overall value > 98% has been found in the study conducted on a total number of more than 60 samples.

The Performance Panel coded PTC 202 and Seroconversion panel coded PTC 901, supplied by BBI, USA, have been also evaluated. Data are reported below:

Performance Panel PTC 202

Sample	CMVM.CE		Abbott EIA	Abbott IMx	Diamedix
ID	OD450nm	S/Co	S/Co	S/Co	S/Co
1	2.028	6.4	> 3.8	5.1	5.4
2	0.081	0.3	0.2	0.2	0.1
3	0.606	1.9	> 3.8	2.2	2.6
4	0.027	0.0	0.5	0.8	0.2
5	0.792	2.5	> 3.8	4.4	2.6
6	0.044	0.1	0.2	0.2	0.0
7	0.081	0.3	0.4	0.2	0.2
8	0.064	0.2	0.3	0.3	0.2
9	0.074	0.2	0.5	0.3	0.2
10	0.054	0.2	0.2	0.1	0.1
11	0.790	2.5	1.3	3.8	1.7
12	0.459	1.4	0.3	0.5	0.1
13	0.725	2.3	> 3.8	3.7	4.7
14	0.065	0.2	0.5	0.6	0.4
15	0.086	0.3	0.3	0.2	0.1
16	0.146	0.5	0.3	0.6	0.1
17	0.092	0.3	1.3	0.7	0.5
18	0.757	2.4	1.2	1.0	1.1
19	0.169	0.5	0.3	0.3	0.2
20	0.060	0.2	0.3	0.2	0.1
21	0.061	0.2	0.4	0.3	0.2
22	3.614	11.3	> 3.8	5.1	5.9
23	0.094	0.3	0.3	0.4	0.1
24	0.095	0.3	0.1	0.1	0.0
25	0.168	0.5	0.2	0.1	0.1

The table below reports the data obtained with the product against the values presented by BBI in its package insert of the Seroconversion Panel PTC 901 for Abbott EIA and bioMérieux VIDAS.

BBI Panel PTC 901

Member ID	CMVM.CE		REF bioMérieux VIDAS	REF Abbott IMx
	OD450nm	S/Co	S/Co	S/Co
01	0.046	0.1	0.3	0.2
02	0.048	0.2	0.3	0.2
03	0.045	0.1	0.3	0.2
04	0.048	0.2	0.3	0.2
05	0.459	1.4	2.7	4.8
06	2.521	7.9	3.2	6.0
07	2.424	7.6	3.0	5.8
08	1.693	5.3	2.8	5.5
09	1.508	4.7	2.6	5.0

3. Diagnostic specificity:

The diagnostic specificity has been determined on panels of more than 300 specimens, negative with the reference kit, derived from normal individuals of European origin.

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

Frozen specimens have also been tested to check whether this interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

A study conducted on more than 60 potentially cross-reactive samples has not revealed any interference in the system.

No cross reaction were observed.

The Performance Evaluation study conducted in a qualified external reference center on more than 400 total samples has provided a value > 98%.

False positive reactions may be anyway pointed out and then ruled out in the interpretation of results with the procedure reported in section T, able to verify whether or not a positive result is real.

4. Precision:

It has been calculated on three samples, a negative, a low positive and a positive, examined in 16 replicates in three separate runs. Results are reported as follows:

CMVM.CE: lot # 0703

Negative (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.036	0.033	0.034	0.034
Std.Deviation	0.003	0.003	0.002	0.003
CV %	9.0	9.8	6.3	8.4

Low reactive (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.727	0.723	0.709	0.720
Std.Deviation	0.022	0.029	0.045	0.032
CV %	3.0	3.9	6.3	4.4

High reactive (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.279	1.980	2.131	2.130
Std.Deviation	0.220	0.186	0.207	0.204
CV %	9.7	9.4	9.7	9.6

CMVM.CE: lot # 0603

Negative (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.027	0.034	0.032	0.031
Std.Deviation	0.005	0.006	0.006	0.006
CV %	17.4	17.8	19.9	18.4

Low reactive (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.617	0.619	0.623	0.620
Std.Deviation	0.033	0.040	0.046	0.039
CV %	5.4	6.4	7.3	6.4

High reactive (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	1.913	1.890	1.895	1.899
Std.Deviation	0.051	0.056	0.047	0.051
CV %	2.7	3.0	2.5	2.7

CMVM.CE: lot # 0403

Negative (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.037	0.038	0.037	0.037
Std.Deviation	0.003	0.005	0.004	0.004
CV %	8.7	12.8	9.6	10.4

Low reactive (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.637	0.644	0.634	0.638
Std.Deviation	0.039	0.029	0.031	0.033
CV %	6.2	4.5	4.9	5.2

High reactive (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	1.962	2.061	2.167	2.063
Std.Deviation	0.019	0.034	0.066	0.039
CV %	1.0	1.6	3.0	1.9

Important note:

The performance data have been obtained proceeding as the reading step described in the section M, point 12.

S. LIMITATIONS

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

Bacterial contamination or heat inactivation of the specimen may affect the absorbance values of the samples with consequent alteration of the level of the analyte.

This test is suitable only for testing single samples and not pooled ones.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. The patient's clinical history, symptomatology, as well as other diagnostic data should be considered.

T. CONFIRMATION TEST

In order to provide the medical doctor with the best accuracy in the follow-up of pregnancy, where a false positive result could lead to an operation of abortion, a confirmation test is reported. The confirmation test has to be carried out on any positive sample before a diagnosis of primary infection of CMV is released to the doctor.

Proceed for confirmation as follows:

1. Prepare the Antigen/Conjugate Complex as described in the proper section. This reagent is called Solution A.
2. Then 25 µl concentrated Enzymatic Conjugate are diluted in 500 µl Antigen Diluent and mixed gently on vortex. Do not use any lyophilized vial of CMV for this procedure ! This solution is called Solution B.
3. The well A1 of the strip is left empty for blanking.
4. The Negative Control is dispensed in the strip in positions B1+C1. This is used for the calculation of the cut-off and S/Co values.
5. The positive sample to be confirmed, diluted 1:101, is dispensed in the strip in position D1+E1.
6. The strip is incubated for 60 min at +37°C.
7. After washing, the blank well A1 is left empty.
8. 100 µl of Solution A are dispensed in wells B1+C1+D1.
9. Then 100 µl of Solution B are added to well E1.
10. The strip is incubated for 60 min at +37°C.
11. After washing, 100 µl Chromogen/Substrate are added to all the wells and the strip is incubated for 20 min at r.t.
12. 100 µl Sulphuric Acid are added to all the wells and then their color intensity is measured at 450nm (reading filter) and at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1.

Interpretation of results is carried out as follows:

1. If the sample in position D1 shows a S/Co value lower than 1.0 a problem of dispensation or contamination in the first test is likely to be occurred. The Assay Procedure in Section M has to be repeated to double check the analysis.
2. If the sample in position D1 shows a S/Co value higher than 1.2 and in position E1 shows a S/Co value still higher than 1.2 the sample is considered a **false positive**. The reactivity of the sample is in fact not dependent on the specific presence of CMV and a crossreaction with the enzymatic tracer conjugate has occurred.
3. If the sample in position D1 shows a S/Co value higher than 1.2 and in position E1 shows a S/Co value lower than 1.2 the sample is considered a **true positive**. The reactivity of the sample is in fact dependent on the specific presence of CMV and not due to any crossreaction.

The following table is reported for the interpretation of results

Well	S/Co		
D1	< 1.0	> 1.2	> 1.2
E1	< 1.0	> 1.2	< 1.2
Interpretation	Problem of contam.	False positive	True positive

REFERENCES

1. Engvall E. and Perlmann P.. J. Immunochemistry, 8, 871-874, 1971
2. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol. 109, 129-135, 1971
3. Remington J.S. and Klein J.O.. In "Infectious diseases of the fetus and newborn infant". Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
4. Volk W.A.. In "Essential of Medical Microbiology". 2nd ed. pp 729, G.B.Lippincott Company, Philadelphia, New York, S.Josè, Toronto.
5. Betts R.F. and al.. Journal of Infectious Diseases, 143:821-826, 1981.
6. Engelhard D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 163.628-630, 1991.
7. Griffiths P.D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 145. 647-653, 1982
8. Kraat Y.J. et al.. Journal of Clin.Microbiol.. 30: 522-524, 1992.
9. Landini M.P. et al.. Eur.J.Clin.Microbiol.. 8: 159-163, 1989

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

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



0318

CMV IgM

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA) de
“captura” para la determinación de
anticuerpos IgM frente Citomegalovirus
en plasma y suero humano**

- Uso exclusivo para diagnóstico “in vitro” -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

CMV IgM

A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos IgM frente Citomegalovirus (CMV) en plasma y suero humanos, mediante un sistema de "captura". El equipo ha sido concebido para el seguimiento de pacientes infectados con CMV y del riesgo de malformaciones en el neonato debidas al CMV durante el embarazo. Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN.

Citomegalovirus (CMV) es un patógeno humano ubicuo, que afecta prevalentemente a niños y adultos jóvenes. Las infecciones por CMV representan aún un importante problema de salud en determinados grupos de pacientes (recién nacidos, receptores de órganos o médula ósea y pacientes con SIDA), en los cuales constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad.

La detección de anticuerpos específicos IgG e IgM contra el virus, representa una herramienta importante en el diagnóstico de las infecciones agudas/primarias, en la reactivación de la infección latente, así como en ausencia de síntomas clínicos típicos. Las infecciones asintomáticas por CMV usualmente se presentan en individuos aparentemente sanos, durante el embarazo o durante algunas enfermedades donde aparece el virus como agente coinfectante.

El sistema ELISA de captura de IgM, de nueva generación, debe su ventaja a antígenos específicos de CMV. Constituye una prueba diagnóstica potente y segura, útil en el seguimiento de las poblaciones de riesgo, sobretodo porque no se ve afectada por la presencia del factor reumatoide.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El ensayo se basa en el principio de "captura de IgM", donde los anticuerpos de esta clase presentes en la muestra son capturados por la fase sólida, recubierta con un anticuerpo anti-IgM humano.

Después del lavado, que elimina el resto de los componentes de la muestra en particular los anticuerpos IgG, se adiciona un complejo compuesto por antígenos biotinizados de CMV y Streptavidina conjugada con Peroxidasa (HRP), lo cual permite detectar los anticuerpos IgM inmovilizados en la fase sólida.

Tras la incubación, los pocillos se lavan para eliminar cualquier traza de conjugado en exceso y se añade el sustrato cromogénico. En presencia del conjugado el sustrato es hidrolizado, generándose un color proporcional a la cantidad de anticuerpos IgM frente a Citomegalovirus presentes en la muestra.

La Prueba de Confirmación controla la presencia de falsos positivos, lo cual permite a los clínicos una correcta interpretación de los resultados.

D. COMPONENTES.

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLATE

12 tiras de 8 pocillos recubiertos con anticuerpo monoespecífico anti-IgM humano, purificado por afinidad, en presencia de proteínas de bovino.

Las placas están en una bolsa sellada con desecante. Se deben poner las mismas a temperatura ambiente antes de abrirlas, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y conservar entre 2 y 8°C.

2. Control Negativo: CONTROL -

1x4.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene 1% de plasma humano negativo a IgM-CMV, 2% de caseína, tampón Tris-Citrato 10 mM pH 6.0+/-0.1, 0.1% de Tween 20, además de azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes. El control negativo es incoloro.

3. Control Positivo: CONTROL +

1x4.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene 1% de plasma humano positivo a IgM-CMV, 2% de caseína, tampón Tris-Citrato 10 mM pH 6.0+/-0.1, 0.1% de Tween 20, además de azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes. El control positivo está codificado con el color verde.

4. Calibrador: CAL ...ml

n° 1 vial. Liofilizado. Para disolver en agua calidad EIA como se indica en la etiqueta. Contiene plasma humano positivo a IgM-CMV, suero bovino fetal, además sulfato de gentamicina 0.2mg/ml y ProClin 300 0.045% como conservantes.

Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del frasco varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen indicado en la etiqueta.

5. Antígenos liofilizados CMV : AG CMV

N° 6 viales liofilizados. Contienen antígenos biotinizados de CMV, 2% de proteínas de bovino, tampón Tris HCl 10 mM pH 6.8+/-0.1 además sulfato de gentamicina 0.2 mg/ml y ProClin 300 0.045% como conservantes. Debe disolverse con 1.9 ml de Diluyente de Antígeno, según se indica más adelante.

6. Tampón de Lavado Concentrado: WASHBUF 20X

1x60ml/botella. Solución concentrada 20x. Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, Tween 20 al 0.05% y ProClin 300 al 0.045%

7. Conjugado: CONJ 20X

1x0.8 ml/vial. Solución concentrada 20x de Streptavidina conjugada con peroxidasa (HPR), diluido en un tampón proteico. Contiene tampón Tris HCl 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, 2% de BSA, además 0.2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 0.045% como conservantes.

8. Diluyente de Antígeno: AG DIL

n° 1 vial de 16 ml. Solución tamponada proteica para la preparación del inmunocomplejo. Contiene tampón Tris HCl 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, 2% de BSA, además 0.2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 0.045% como conservantes. El reactivo está codificado con el color rojo (0.01% de colorante rojo).

9. Diluyente de muestras DILSPE

2x60ml. Solución tamponada proteica para la dilución de las muestras. Contiene 2% de caseína, tampón Tris citrato 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, 0.1% de Tween 20, además azida sódica al 0.09% y 0.045% de ProClin 300 como conservantes. El reactivo está codificado con el color azul (0.01% de colorante azul).

10. Cromógeno/Substrato SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato-fosfato 50mM pH 3.5-3.8, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02% así como dimetilsulfóxido 4%.

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

11. Ácido Sulfúrico: H2SO4 0.3M

1x15ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0.3M
Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

12. Sellador adhesivo, n° 2

13. Manual de instrucciones, n° 1

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (1000µl, 100µl y 10µl) y puntas plásticas desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) fijo a 37°C (+/-0.5°C tolerancia).
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El equipo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar los indumentos protectoras adecuadas de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los equipos, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del substrato a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar reactivos de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos.
7. Comprobar que los reactivos no contengan precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el producto después de la fecha de vencimiento indicada en el equipo e internamente en los reactivos. Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en equipos abiertos, en uso por un período de hasta 3 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infectivas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.

13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infectivos y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Se recomienda el uso del código de barras.
3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Estudios de estabilidad realizados en equipos en uso no han arrojado pérdida de actividad significativa en un período de hasta 3 meses.

Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación. De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas, deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes, se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie de amarillo a verde.

Control Negativo:

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

Control Positivo:

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

Calibrador:

Añadir al polvo liofilizado, el volumen de agua de calidad ELISA indicado en la etiqueta. Dejar disolver completamente y después mezclar cuidadosamente con el vórtex antes de usar.

Nota: Una vez reconstituida, la solución no es estable. Se recomienda mantenerla congelada en alícuotas a -20°C .

Solución de Lavado Concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada y mezclarse delicadamente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre $+2$ y 8°C .

Complejo Antígeno/Conjugado:

Proceder cuidadosamente según se indica:

1. Disolver el contenido de un vial liofilizado utilizando 1.9 ml de Diluyente de Antígeno. Dejar disolver completamente y luego mezclar cuidadosamente con el vórtex.
2. Mezclar el Conjugado concentrado con ayuda del vórtex. Añadir después 0.1 ml del mismo al vial del Ag CMV disuelto y mezclar suavemente en el vórtex.

Notas Importantes:

1. Disolver y preparar solamente los viales necesarios para la prueba. El inmunocomplejo obtenido no es estable. Almacenar la solución sobrante en alícuotas a -20°C .
2. La preparación del inmunocomplejo debe realizarse **justo antes** de dispensar las muestras y los controles en la placa. Mezclar nuevamente en vórtex justo antes de usar.

Diluyente de muestras :

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

Cromógeno/ Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Ácido Sulfúrico:

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

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

Leyenda:

Indicación de peligro, Frases H

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, Frases P

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

1. Las micropipetas deben ser calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (alcohol 70%, lejía 10%, de calidad de los desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de $\pm 2\%$. Deben descontaminarse periódicamente los residuos de los componentes del equipo.
2. La incubadora de ELISA debe ser ajustada a 37°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ de tolerancia) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 μl /pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.
4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de $\pm 5\%$.
5. El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro de 620-630nm, obligatorio para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda $\leq 10\text{nm}$ b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2.0 , c) Linealidad ≥ 2.0 , reproducibilidad $\geq 1\%$. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar la correcta medida de la densidad óptica, según las normas del fabricante.
En caso de usar un sistema automatizado de ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en las secciones "Control interno de calidad" y "Procedimiento del ensayo". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos por contaminación de los pocillos adyacentes por muestras fuertemente reactivas. Se recomienda el uso de sistemas automatizados para el pesquaje en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.

- El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

- Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del equipo (envase primario). No usar si ha caducado.
- Compruebe que los componentes líquidos no están contaminados con partículas o agregados visibles. Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico. Compruebe que no han ocurrido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no sean rota o dañada.
- Disolver el Calibrador como se ha descrito anteriormente y mezclar suavemente.
- Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
- Dejar los componentes restantes hasta alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
- Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y alimentar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
- Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
- En caso de trabajar automáticamente, encender el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
- Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
- Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
- En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

M.1 Ensayo automatizado:

En caso de que el ensayo se realice de manera automatizada con un sistema ELISA, se recomienda programar el equipo para aspirar 1000µl de Diluyente de Muestras, y posteriormente 10µl de muestra (factor de dilución 1:101).

La mezcla debe ser dispensada cuidadosamente en un tubo de dilución. Antes de aspirar la muestra siguiente, las agujas deben lavarse debidamente para evitar cualquier contaminación cruzada entre las muestras. Cuando todas las muestras han sido diluidas, programar el equipo para dispensar 100 µl de las mismas en los pocillos correspondientes.

Este procedimiento puede realizarse en dos pasos de dilución de 1:10 cada uno (90 µl de Diluyente de Muestras + 10 µl de muestra) en una segunda plataforma de dilución. Programar el equipo para aspirar primeramente 100 µl de Diluyente de Muestras, después 10 µl de la primera dilución en la plataforma y finalmente dispensar todo el contenido en los pocillos apropiados de la microplaca.

No diluir el Calibrador ni los controles, ya que están listos para el uso.

Dispensar 100µl de controles/calibrador en los pocillos correspondientes.

Para las operaciones siguientes, consulte las instrucciones que aparecen debajo para el Ensayo Manual.

Es muy importante comprobar que el tiempo entre el dispensado de la primera y la última muestra sea calculado por el instrumento y considerado para los lavados.

M. 2 Ensayo Manual.

- Diluir las muestras 1:101 dispensando primeramente 10 µl de muestra y después 1 ml de Diluyente de Muestras en un tubo de dilución, mezclar bien con vórtex.
- Poner el número de tiras necesarias en el soporte plástico. Dejar el pocillo A1 vacío para el blanco.
- Dispensar 100 µl del Control Negativo por duplicado, 100µl de Calibrador por duplicado y 100µl del Control Positivo, en los respectivos pocillos. No diluir los controles ni el calibrador ya que están listos para el uso.
- Dispensar 100 µl de las muestras diluidas en los pocillos correspondientes y chequear después que estos pocillos son de color azul y que los controles y el calibrador han sido añadidos.
- Incubar la microplaca **60 min a +37°C**.

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

- Lavar la microplaca con el lavador automático dispensando y aspirando según se indica (section I.3).
- Dispensar 100µl del **Complejo Antígeno/conjugado** en todos los pocillos, excepto en el A1 y cubrir con el sellador. Compruebe que este reactivo de color rojo haya sido añadido en todos los pocillos excepto el A1.

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

- Incubar la microplaca **60 min a +37°C**.
- Lavar la microplaca, de igual forma que en el paso 6.
- Dispensar 100µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1. Incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) por 20 minutos**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

- Dispensar 100µl de Ácido Sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 10. La adición del ácido cambia el color de los controles positivos y las muestras positivas de azul a amarillo.
- Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

Notas generales importantes:

- Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
- La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de stop y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.
- El calibrador (CAL) no afecta al cálculo del valor de corte y, por lo tanto, no afecta al cálculo de los resultados de la prueba. El calibrador (CAL) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO.

Controles&Calibrador	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
1^{ra} incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Inmunocomplejo	100 µl
2^{da} incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Mezcla TMB/H2O2	100 µl
3^{ra} incubación	20 min
Temperatura	t.a.*
Ácido Sulfúrico	100 µl
Lectura DO.	450nm / 620-630nm

t.a.*temperatura ambiente

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado:

Microplaca												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M 3										
B	CN	M 4										
C	CN	M 5										
D	CAL	M 6										
E	CAL	M 7										
F	CP	M 8										
G	M 1	M 9										
H	M 2	M10										

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

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza un control de validación sobre los controles y el calibrador cada vez que se usa el equipo, para verificar si el performance del ensayo es el esperado.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Exigencia
Pocillo Blanco	< 0.05 DO450nm
Control Negativo, valor medio (CN)	< 0.150 DO450nm valor después de leer el blanco Coeficiente de variación < 30%
Calibrador	M/Co > 0.75
Control Positivo	> 0.750 DO450nm

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

En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe:

Problema	Compruebe que
Pocillo blanco > 0.050 DO450nm	la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
Control Negativo (CN) > 0.150 DO450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación > 30%	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido alimentado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del control

	negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
Calibrador M/Co < 0.75	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el control negativo en lugar del calibrador). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
Control Positivo < 0.750 DO450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control negativo en lugar del positivo). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si ocurre alguno de los problemas anteriores, después de comprobar, informe al responsable para tomar las medidas pertinentes.

Nota importante:

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

P. CÁLCULO DEL VALOR DE CORTE.

Los resultados de la prueba se calculan a partir de un valor medio de DO450nm/620-630nm del control Negativo (CN), mediante un valor de corte (Co) hallado con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de corte} = \text{CN} + 0.250$$

El valor encontrado en la prueba es utilizado para la interpretación de los resultados, según se describe a continuación.

Nota Importante: Cuando el cálculo de los resultados se halla mediante el sistema operativo de un equipo de ELISA automático, asegurarse de que la formulación usada para el cálculo del valor de corte, y para la interpretación de los resultados sea correcta.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

La interpretación de los resultados se realiza mediante la relación entre las DO a 450nm/620-630nm de las muestras (M) y el Valor de corte (Co).

Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

(M/Co)	Interpretación
< 1.0	Negativo
1.0 – 1.2	Equívoco
> 1.2	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no está padeciendo infección aguda por Citomegalovirus. Cualquier paciente, cuya muestra resulte equívoca debe someterse a una nueva prueba con una segunda muestra de sangre colectada 1 ó 2 semanas después de la inicial.

Un resultado positivo es indicativo de infección por CMV.
A continuación, un ejemplo de los cálculos a realizar (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 12).

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

Control Negativo: 0.050 – 0.060 – 0.070 DO 450nm
Valor medio: 0.060 DO 450nm
Menor de 0.150 – Válido
Control Positivo: 1.850 DO 450nm
Mayor de 0.750 – Válido

Valor de corte = 0.060+0.250 = 0.310

Calibrador: 0.550 - 0.530 DO 450nm
Valor medio: 0.540 DO 450nm M/Co = 1.7
M/Co Mayor de 0.75 – Válido

Muestra 1: 0.070 DO 450nm
Muestra 2: 1.690 DO 450nm
Muestra 1 M/Co < 1 = negativa
Muestra 2 M/Co > 1.2 = positiva

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Debe ponerse particular atención a la interpretación de los resultados ante sospecha de infección primaria por CMV en el embarazo, debido al riesgo de malformaciones en el neonato.
3. Antes de emitir un criterio de positividad, cada muestra positiva debe ser sometida a la Prueba Confirmatoria reportada en la sección T. Mediante la misma es posible descartar cualquier error en la interpretación del resultado analítico producido por una falsa reactividad de la muestra.
4. En el monitoreo de infección por CMV durante el embarazo, se recomienda, antes de tomar cualquier decisión médica preventiva, confirmar cualquier resultado positivo, primero con el procedimiento descrito y después con un sistema de detección de CMV IgM.
5. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
6. El diagnóstico de infección debe ser evaluado y comunicado al paciente por un médico calificado.

R. PERFORMANCES.

1. Límite de detección.

En ausencia de un estándar internacional, Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. ha definido un Gold Standard Interno (o IGS), a partir de una muestra positiva a IgM CMV. Las curvas de dilución obtenidas utilizando este material de referencia se reportan a continuación:

Valores DO 450nm

IGS dilución	CMVM.CE Lote # 0703	CMVM.CE Lote # 0603	CMVM.CE Lote # 0403
3X	1.262	1.155	1.109
6X	0.593	0.642	0.570
12X	0.210	0.277	0.225
24X	0.100	0.115	0.110
Negativo	0.015	0.029	0.030

Para crear curvas de dilución limitante se empleó además la preparación Accurun n° 146 para CMV IgM, suministrada por Boston Biomedical Inc., Estados Unidos. Los valores se muestran a continuación.

Valores DO 450nm

Accurun # 146	CMVM.CE Lote # 0703	CMVM.CE Lote # 0603	CMVM.CE Lote # 0403
1X	0.653	0.596	0.603
2X	0.339	0.312	0.301
4X	0.165	0.159	0.148
8X	0.070	0.075	0.069
16X	0.020	0.031	0.027
Negativo	0.013	0.015	0.012

2. Sensibilidad Diagnóstica:

La sensibilidad diagnóstica se ha estudiado utilizando paneles de muestras, clasificadas como positivas mediante un equipo de referencia US FDA.

Las muestras positivas se obtuvieron de pacientes con infección por Citomegalovirus, confirmada mediante análisis clínicos y la observación de los síntomas.

El valor del análisis obtenido después del estudio de más de 60 muestras, fue > 98%.

Se evaluaron además el Performance Panel PTC 202 y el Panel de Seroconversión PTC 901, suministrados por BBI, Estados Unidos.

Los valores se muestran a continuación.

Performance Panel PTC 202

Muestra	CMVM.CE		Abbott EIA	Abbott IMx	Diamedix
ID	DO450nm	M/Co	M/Co	M/Co	M/Co
1	2.028	6.4	> 3.8	5.1	5.4
2	0.081	0.3	0.2	0.2	0.1
3	0.606	1.9	> 3.8	2.2	2.6
4	0.027	0.0	0.5	0.8	0.2
5	0.792	2.5	> 3.8	4.4	2.6
6	0.044	0.1	0.2	0.2	0.0
7	0.081	0.3	0.4	0.2	0.2
8	0.064	0.2	0.3	0.3	0.2
9	0.074	0.2	0.5	0.3	0.2
10	0.054	0.2	0.2	0.1	0.1
11	0.790	2.5	1.3	3.8	1.7
12	0.459	1.4	0.3	0.5	0.1
13	0.725	2.3	> 3.8	3.7	4.7
14	0.065	0.2	0.5	0.6	0.4
15	0.086	0.3	0.3	0.2	0.1
16	0.146	0.5	0.3	0.6	0.1
17	0.092	0.3	1.3	0.7	0.5
18	0.757	2.4	1.2	1.0	1.1
19	0.169	0.5	0.3	0.3	0.2
20	0.060	0.2	0.3	0.2	0.1
21	0.061	0.2	0.4	0.3	0.2
22	3.614	11.3	> 3.8	5.1	5.9
23	0.094	0.3	0.3	0.4	0.1
24	0.095	0.3	0.1	0.1	0.0
25	0.168	0.5	0.2	0.1	0.1

La tabla siguiente muestra los datos obtenidos al enfrentar el producto al Panel de Seroconversión BBI PTC 901, para Abbott EIA y bioMérieux VIDAS.

BBI Panel PTC 901

Miembro ID	CMVM.CE		REF bioMerieux VIDAS	REF Abbott IMx
	DO450nm	M/Co	M/Co	M/Co
01	0.046	0.1	0.3	0.2
02	0.048	0.2	0.3	0.2
03	0.045	0.1	0.3	0.2
04	0.048	0.2	0.3	0.2
05	0.459	1.4	2.7	4.8
06	2.521	7.9	3.2	6.0
07	2.424	7.6	3.0	5.8
08	1.693	5.3	2.8	5.5
09	1.508	4.7	2.6	5.0

3. Especificidad Diagnóstica :

La especificidad diagnóstica ha sido determinada utilizando paneles de más de 300 muestras provenientes de individuos sanos de origen europeo, clasificadas como negativas mediante un equipo de referencia.

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

Las muestras congeladas han sido analizadas para comprobar si la colección y la conservación interfiere con el procedimiento del ensayo. No se ha observado interferencia a partir de muestras limpias y libres de agregados.

Un estudio realizado con más de 60 muestras que pudieran presentar potencialmente reactividad cruzada, no reveló interferencia alguna en el sistema. No se detectó reacción cruzada.

El estudio para evaluar el performance, realizado en un centro de referencia externo con más de 400 muestras totales, reveló un valor > 98%.

El procedimiento reportado en la sección T permite detectar y descartar los falsos positivos en la interpretación de los resultados y por tanto verificar si un resultado positivo es real.

La Prueba de Confirmación es un sistema que permite estimar, con un 100% de confiabilidad, la especificidad de una prueba (ya que en ausencia de un antígeno específico, un resultado positivo no es posible).

4. Precisión:

Ha sido calculada a partir de tres muestras, una negativa, una debilmente positiva y una positiva, examinadas en 16 réplicas en tres series separadas.

Los resultados son los siguientes:

CMVM.CE: lote # 0703

Negativa (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.036	0.033	0.034	0.034
Desviación estándar	0.003	0.003	0.002	0.003
CV %	9.0	9.8	6.3	8.4

Débil reactiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.727	0.723	0.709	0.720
Desviación estándar	0.022	0.029	0.045	0.032
CV %	3.0	3.9	6.3	4.4

Altamente reactiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	2.279	1.980	2.131	2.130
Desviación estándar	0.220	0.186	0.207	0.204
CV %	9.7	9.4	9.7	9.6

CMVM.CE: lote # 0603

Negativa (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.027	0.034	0.032	0.031
Desviación estándar	0.005	0.006	0.006	0.006
CV %	17.4	17.8	19.9	18.4

Débil reactiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.617	0.619	0.623	0.620
Desviación estándar	0.033	0.040	0.046	0.039
CV %	5.4	6.4	7.3	6.4

Altamente reactiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	1.913	1.890	1.895	1.899
Desviación estándar	0.051	0.056	0.047	0.051
CV %	2.7	3.0	2.5	2.7

CMVM.CE: lote # 0403

Negativa (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.037	0.038	0.037	0.037
Desviación estándar	0.003	0.005	0.004	0.004
CV %	8.7	12.8	9.6	10.4

Débil reactiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.637	0.644	0.634	0.638
Desviación estándar	0.039	0.029	0.031	0.033
CV %	6.2	4.5	4.9	5.2

Altamente reactiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	1.962	2.061	2.167	2.063
Desviación estándar	0.019	0.034	0.066	0.039
CV %	1.0	1.6	3.0	1.9

Nota importante:

Los datos de rendimiento se obtuvieron siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 12.

S. LIMITACIONES.

La contaminación bacterica o la inactivación por calor de la muestra pueden afectar los valores de DO y por tanto alterar los niveles del analita.

Las muestras que después de ser descongeladas presentan partículas de fibrina o partículas agregadas, generan algunos resultados falsos positivos.

El ensayo es útil solo para probar muestras independientes y no mezclas.

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no debe establecerse en base a un solo resultado, sino que deben

tenerse en consideración la historia clínica del paciente, la sintomatología, así como otros datos diagnósticos.

T. PRUEBA DE CONFIRMACIÓN.

Se realiza esta prueba con el propósito de garantizar la mayor precisión del ensayo en el seguimiento del embarazo, donde un resultado falso positivo puede conducir a un aborto. La misma debe realizarse a cada una de las muestras positivas, antes de emitir un diagnóstico de infección por CMV.

Proceder para la confirmación como sigue:

1. Preparar el Complejo Antígeno/Conjugado según se describe en la sección. Este reactivo se denomina Solución A.
2. Diluir 25 µl del Conjugado concentrado en 500 µl de Diluyente de Antígeno, mezclar delicadamente con ayuda del vórtex. No usar para este procedimiento ningún vial liofilizado de CMV! Este reactivo se denomina Solución B.
3. Dejar vacío el pocillo A1 para el blanco.
4. Dispensar el Control Negativo en las posiciones B1+C1, el mismo se usa para calcular el valor de corte y los valores M/Co.
5. La muestra positiva a confirmar, diluida 1:101, se añade en las posiciones D1+E1.
6. Incubar la tira durante 60 min a +37°C.
7. después del lavado el pocillo A1 queda vacío.
8. Dispensar 100 µl de la Solución A en los pocillos B1+C1+D1.
9. Dispensar 100 µl de la Solución B en el pocillo E1.
10. Incubar la tira durante 60 min a +37°C.
11. Después del lavado, adicionar a todos los pocillos 100 µl del Cromógeno/Substrato, posteriormente incubar la tira durante 20 minutos a t.a.
12. Dispensar 100 µl de Ácido sulfúrico en todos los pocillos, medir después la intensidad del color utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

La interpretación de los resultados se realiza de la siguiente forma:

1. Si la muestra en posición D1 tiene un valor de M/Co menor de 1.0, probablemente en el primer ensayo haya ocurrido un error en el dispensado o alguna contaminación. Debe repetirse el Procedimiento del Ensayo, sección M.
2. Si la muestra en posición D1 tiene un valor de M/Co mayor de 1.2 y en posición E1 el valor de M/Co es todavía mayor de 1.2, la muestra se considera un **falso positivo**. La reactividad de la muestra, en este caso, no depende de la presencia específica de CMV, por lo tanto ha ocurrido una reacción cruzada con el marcado con HRP.
3. Si la muestra en posición D1 tiene un valor de M/Co mayor de 1.2 y en la posición E1 el valor M/Co es menor de 1.2 se considera **realmente positiva**. La reactividad de la muestra, en este caso se debe a la presencia específica de CMV y no a reacciones cruzadas.

En la siguiente tabla se muestra la interpretación de los resultados:

Pocillo	M/Co		
D1	< 1.0	> 1.2	> 1.2
E1	< 1.0	> 1.2	< 1.2
Interpretación	Probl. de contam.	Falso positivo	Realmente positivo

BIBLIOGRAFÍA.

1. Engvall E. and Perlmann P.. J. Immunochemistry, 8, 871-874, 1971
2. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol. 109, 129-135, 1971
3. Remington J.S. and Klein J.O.. In "Infectious diseases of the fetus and newborn infant". Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
4. Volk W.A.. In "Essential of Medical Microbiology". 2nd ed. pp 729, G.B.Lippincott Company, Philadelphia, New York, S.Josè, Toronto.
5. Betts R.F. and al.. Journal of Infectious Diseases, 143:821-826, 1981.
6. Engelhard D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 163.628-630, 1991.
7. Griffiths P.D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 145. 647-653, 1982
8. Kraat Y.J. et al.. Journal of Clin.Microbiol.. 30: 522-524, 1992.
9. Landini M.P. et al.. Eur.J.Clin.Microbiol.. 8: 159-163, 1989

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el mercado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

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

CE
0318

EBNA IgG

**Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for
the quantitative/qualitative
determination of IgG antibodies to
Epstein Barr Virus Nuclear Antigen
in human serum and plasma**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF EBNG.CE
96 Tests

EBNA IgG

A. INTENDED USE

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

B. INTRODUCTION

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

C. PRINCIPLE OF THE TEST

In order to get rid of crossreactions with other viruses of the same family, microplates are coated with affinity purified native EBNA antigen, capable to provide the assay with the highest specificity.

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

After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti-EBNA IgG are detected by the addition of anti hIgG antibody, labeled with peroxidase (HRP). The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti EBNA IgG antibodies present in the sample.

IgG in the sample may therefore be quantitated by means of a standard curve calibrated in arbitrary units per milliliter (arbU/ml) as no international standard is available.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 microwells coated with affinity purified native EBNA antigen. Plates are sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

2. Calibration Curve: CAL N° ..

Ready to use and color coded standard curve ranging:

4 ml CAL1 = 0 arbU/ml
4 ml CAL2 = 5 arbU/ml
2 ml CAL3 = 10 arbU/ml
2 ml CAL4 = 20 arbU/ml
2ml CAL 5 = 50 arbU/ml
4 ml CAL6 = 100 arbU/ml.

Standards are calibrated against an internal Gold Standard or IGS as no international one is defined.

Contains human serum proteins, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. Standards are blue colored.

3. Control Serum: CONTROL ...ml

1 vial. Lyophilized.

It contains fetal bovine serum proteins, human IgG antibodies to EBNA at 20 arbU/ml+20%, 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

3. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle20x concentrated solution.

Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

4. Enzyme conjugate : CONJ

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

5. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

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

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

6. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vial it contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

7. Specimen Diluent: DILSPE

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

8. Plate sealing foils n°2

9. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for

Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.

4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.

5. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.

6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.

7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.

8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.

9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.

10. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit did not pointed out any relevant loss of activity up to six 6 uses of the device and up to 3 months.

11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

12. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.

13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..

14. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.

15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water

16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.

2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.

3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.

5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

6. Samples whose anti-EBNA IgG antibody concentration is expected to be higher than 100 arbU/ml should be diluted before use, either 1:10 or 1:100 in the Calibrator 0 arbU/ml. Dilutions have to be done in clean disposable tubes by diluting 50 ul of each specimen with 450 ul of Cal 0 (1:10). Then 50 ul of the 1:10 dilution are diluted with 450 ul of the Cal 0 (1:100). Mix tubes thoroughly on vortex and then proceed toward the dilution step reported in section M.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of storing.

In this case call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back inside the aluminum pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°..8°C.

Important Note: After first opening, remaining strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

Calibration Curve

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

Control Serum

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilised powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex.

Note: The control after dissolution is not stable. Store frozen in aliquots at -20°C.

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

Sample Diluent

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

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/- 0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).
5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.
An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of $\pm 5\%$.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0 ; (c) linearity to ≥ 2.0 ; repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well

identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.

6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Validation of Test" and "Assay Performances". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dissolve the content of the Control Serum as reported.
6. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
7. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
8. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
9. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
10. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
11. Check that the micropipettes are set to the required volume.
12. Check that all the other equipment is available and ready to use.
13. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

The kit may be used for quantitative and qualitative determinations as well.

M1. QUANTITATIVE DETERMINATION:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the A1 and B1 empty for the operation of blanking.
3. Dispense 100 µl of Calibrators and 100 µl Control Serum in duplicate. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
4. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

5. Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section I.3).
6. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except A1+B1 blanking wells, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1 and B1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

7. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
8. Wash microwells as in step 5.
9. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank wells A1 and B1 included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

10. Pipette 100 µl Sulphuric Acid to stop the enzymatic reaction into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
11. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1 or B1 or both.

M2. QUALITATIVE DETERMINATION

If only a qualitative determination is required, proceed as described below:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.
3. Dispense 100 µl of Calibrator 0 arbU/ml and Calibrator 10 arbU/ml in duplicate and Calibrator 100 arbU/ml in single. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
4. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

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

6. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the A1 well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

7. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
8. Wash microwells as in step 5.
9. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

10. Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
11. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

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

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Calibrators & Control(*)	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm/620-630nm

(*) Important Notes:

- The Control Serum (CS) it does not affect the test's results calculation.
- The Control Serum (CS) used only if a laboratory internal quality control is required by the Management.

An example of dispensation scheme for Quantitative Analysis is reported below:

Microplate												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S 1									
B	BLK	CAL4	S 2									
C	CAL1	CAL5	S 3									
D	CAL1	CAL5	S 4									
E	CAL2	CAL6	S 5									
F	CAL2	CAL6	S 6									
G	CAL3	CS(*)	S 7									
H	CAL3	CS(*)	S 8									

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrator
S = Sample CS(*)= Control Serum - Not mandatory

An example of dispensation scheme in qualitative assays is reported below:

Microplate												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S3	S11									
B	CAL1	S4	S12									
C	CAL1	S5	S13									
D	CAL3	S6	S14									
E	CAL3	S7	S15									
F	CAL6	S8	S16									
G	S1	S9	S17									
H	S2	S10	S18									

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrators
S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the calibrators any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as qualified.

Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
CAL 1 0 arbU/ml	< 0.150 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
CAL 2 5 arbU/ml	OD450nm > OD450nm CAL1 + 0.100
CAL 3 10 arbU/ml	OD450nm > OD450nm CAL1 + 0.200
CAL 6 100 arbU/ml	OD450nm > 1.000

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

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

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Sustrate solution has not got contaminated during the assay
CAL 1 0 arbU/ml > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use;

variation > 30%	3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive calibrator instead of the negative one; 4. that no contamination of the negative calibrator or of their wells has occurred due spills of positive samples or the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
CAL 2 5 arbU/ml OD450nm < OD450nm CAL1 + 0.100	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (ex.: dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
CAL 3 10 arbU/ml OD450nm < OD450nm CAL1 + 0.200	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (ex.: dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
CAL 6 100 arbU/ml < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead) ; 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

** Note:

If Control Serum has used, verify the following data:

Check	Requirements
Control Serum	Mean OD450nm CAL4 +/-20%

If the results of the test doesn't match the requirements stated above, operate as follows:

Problem	Check
Control Serum Different from Expected value	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the control has occurred.

Anyway, if all other parameters (Blank, CAL1, CAL2, CAL 6), match the established requirements, the test may be considered valid.

Important note:

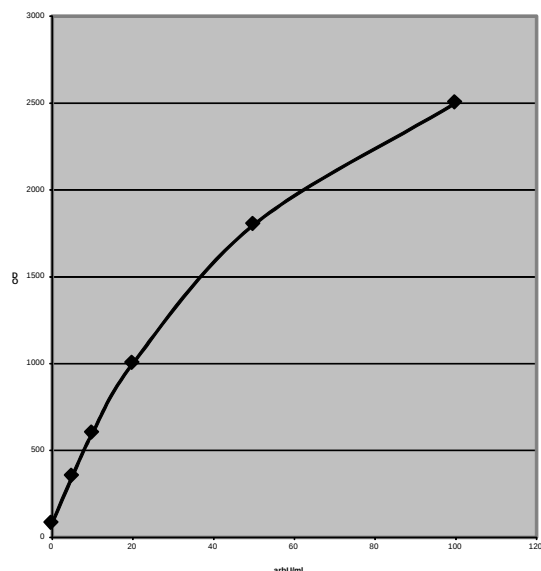
The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 11.

P. RESULTS

P.1 Quantitative method

If the test turns out to be valid, use for the quantitative method an approved curve fitting program to draw the calibration curve from the values obtained by reading at 450nm/620-630nm (4-parameters interpolation is suggested). Then on the calibration curve calculate the concentration of anti EBNA IgG antibody in samples.

An example of Calibration curve is reported below.



Important Note:

Do not use the calibration curve above to make calculations.

P.2 Qualitative method

In the qualitative method, calculate the mean OD450nm/620-630nm values for the Calibrators 0 and 10 arbU/ml and then check that the assay is valid.

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

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

Calibrator 0 arbU/ml: 0.020 – 0.024 OD450nm
Mean Value: 0.022 OD450nm
Lower than 0.150 – Accepted

Calibrator 10 arbU/ml: 0.450 – 0.470 OD450nm
Mean Value: 0.460 OD450nm
Higher than Cal 0 + 0.200 – Accepted

Calibrator 100 arbU/ml: 2.045 OD450nm
Higher than 1.000 – Accepted

The OD450nm/620-630nm of the Calibrator 10 arbU/ml is considered the cut-off (or Co) of the system.

The ratio between the OD450nm/620-630nm value of the sample and the OD450nm/620-630nm of the Calibrator 10 arbU/ml (or S/Co) can provide a semi-quantitative estimation of the content of specific IgG in the sample.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Samples with a concentration lower than 5 arbU/ml are considered negative for anti EBNA IgG antibody.

Samples with a concentration ranging 5-10 arbU/ml are considered in the gray-zone. Samples with a concentration higher than 10 arbU/ml are considered positive for anti EBNA IgG antibody.

EBNA IgG results alone are not, anyway, enough to provide a clear diagnosis of EBV infection. At least EBV VCA IgM results are necessary in combination.

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

VCA IgM	EBNA IgG	Interpretation
negative	negative	No history of EBV infection
positive	negative	Acute primary infection
negative	positive	History of previous infection
positive	positive	Reactivation

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
3. Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted in an external clinical center on negative and positive samples with reference to a FDA approved commercial kit.

1. Limit of detection

No international standard for EBNA IgG Antibody detection has been defined so far by the European Community.

In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient with an history of past mononucleosis infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The method is based on the use of an affinity purified native EBNA antigen to provide the assay with the highest specificity to EBV.

The diagnostic performances were evaluated in a performance evaluation study conducted in an external centre, with excellent experience in the diagnosis of infectious diseases and in particular in EBV infection.

The Diagnostic Sensitivity was studied on more than 50 samples, pre-tested positive with two reference kits of European origin in use at the laboratory. Positive samples were collected from patients that experienced mononucleosis infection.

The diagnostic specificity was determined on panels of more than 50 negative samples from normal individuals and blood

donors, classified negative with the reference kit, including potentially interfering specimens.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the specificity.

No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed.

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

The Performance Evaluation provided the following values :

Sensitivity	≥ 98 %
Specificity	≥ 98 %

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System in compliance with ISO 13485 rule. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

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



3. Reproducibility:

Data obtained from a study conducted on three samples of different EBNA IgG reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs show CV% values ranging 5-20% depending on OD450nm/620-630nm readings.

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

S. LIMITATIONS

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

Depending on the reference kit in use, due to some heterogeneity among different devices, the presence of 2-5% false reactivity may be seen.

REFERENCES

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

EBNA IgG

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para
la determinación cualitativa/cuantitativa
de anticuerpos IgG al Antígeno Nuclear
del Virus Epstein Barr
en plasma y suero humanos**

- Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro" -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF EBNG.CE
96 pruebas

EBNA IgG

A. OBJETIVO DEL ESTUCHE.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa/cuantitativa de anticuerpos IgG al Antígeno Nuclear del Virus Epstein Barr (EBNA), en plasma y suero humanos. Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN.

El Virus Epstein Barr (EBV) es considerado el principal agente etiológico de la Mononucleosis Infecciosa, así como del Linfoma de Burkitt y del Carcinoma Nasofaríngeo. Perteneció a la familia *Herpesviridae* y está ampliamente distribuido en el mundo, se estima que entre un 80 y un 90% de los adultos esté infectado con el virus. Las infecciones primarias ocurren generalmente en la primera década de vida. Mientras en la infancia son en su mayoría asintomáticas, el 50-70% de los adultos jóvenes con infecciones primarias puede desarrollar de formas leves a severas de la enfermedad.

EBV causa infecciones latentes que pueden reactivarse en condiciones de inmunodepresión (personas inmunocomprometidas o pacientes SIDA). Debido a que la respuesta humoral a la infección primaria por EBV es bastante rápida, los niveles de anticuerpos presentes, así como la clase de los mismos, permiten determinar si un paciente es susceptible, si presenta una infección primaria reciente, en curso, o si está ocurriendo una reactivación de la infección por EBV.

La detección de anticuerpos IgG, IgM e IgA específicos contra los principales antígenos inmunodominantes del virus (Antígeno Nuclear o EBNA y Antígeno Capsídico Viral o VCA), constituye una herramienta importante tanto para el monitoreo de pacientes infectados por EBV como para los estudios epidemiológicos.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

Con la finalidad de reducir reacciones cruzadas con otros virus de la misma familia las microplacas están recubiertas con antígeno nativo EBNA purificado por afinidad, en grado de garantizar una alta especificidad.

En la primera incubación, se adicionan las muestras diluidas y si están presentes en las mismas los anticuerpos IgG anti-EBNA, quedan capturados por los antígenos de la fase sólida. Luego del lavado que elimina el resto de los componentes de la muestra, en la segunda incubación los anticuerpos IgG anti-EBNA inmovilizados en la fase sólida son detectados mediante un anticuerpo anti-IgG humana marcado con peroxidasa (HRP). Posteriormente se añade la mezcla cromógeno/substrato, la cual se combina con la enzima conjugada unida a la fase sólida, dando lugar a una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG anti-EBNA presentes en la muestra, la misma es detectable mediante un lector ELISA.

La cuantificación de los anticuerpos IgG presentes en la muestra se realiza mediante una curva estándar calibrada en unidades arbitrarias por mililitro (arbU/ml), ya que no hay disponible hasta el momento ningún estándar internacional.

D. COMPONENTES.

Cada estuche contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLATE

12 tiras x 8 pocillos intercambiables recubiertos antígeno nativo EBNA purificado por afinidad. Las microplacas están almacenadas en bolsas selladas con desecante y deben ser puestas a temperatura ambiente antes de abrirlas, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y almacenar a 4°C.

2. Curva de Calibración: CAL N° ...

Listo para el uso. Curva estándar con código de color:

4 ml CAL1 = 0 arbU/ml
4 ml CAL2 = 5 arbU/ml
2 ml CAL3 = 10 arbU/ml
2 ml CAL4 = 20 arbU/ml
2 ml CAL 5 = 50 arbU/ml
4 ml CAL6 = 100 arbU/ml.

Los estándares han sido calibrados contra un Gold Standard interno (IGS), ya que no se ha definido uno internacional. Contiene proteínas del suero humano, 2% de caseína, tampón citrato de sodio 10 mM pH 6+/-0.1, 0.1% de Tween 20, así como azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como preservativos. La Curva de Calibración está codificada con el color azul.

3. Suero Control: CONTROL ...ml

1 vial. Liofilizado.

Contiene suero fetal bovino, anticuerpos IgG humanos anti-EBNA a 20 ±20% arbU/ml, 0.2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 0.045% como preservativos.

4. Tampón de Lavado Concentrado: WASHBUF 20X

1x60ml/botella. Solución concentrada 20x.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0+/- 0.2, Tween 20 al 0.05% y ProClin 300 al 0.045%

5. Conjugado: CONJ

1x16ml/vial. Listo para el uso, codificado con el color rojo. Contiene anticuerpos policlonales anti-IgG humanos marcados con peroxidasa (HRP), tampón Tris 10 mM pH 6.8+/-0.1, BSA 5%, además de sulfato de gentamicina 0.02 % y ProClin 300 0.045% como preservativos.

6. Cromógeno/Substrato: SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato-fosfato 50mM pH 3.5-3.8, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02% así como dimetilsulfóxido 4%.

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

7. Ácido Sulfúrico: H2SO4 0.3 M

1x15ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0.3M

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

8. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60ml/vial. Solución tamponada proteica para la dilución de las muestras. Contiene 2% de caseína, tampón citrato de sodio a pH 6.0 +/- 0.1, 0.1% de Tween 20, además de azida sódica al 0.09% y 0.045% de ProClin 300 como preservativos.

9. Sellador adhesivo, n° 2

10. Manual de instrucciones, n° 1

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (1000, 100 y 10ul) y puntas plásticas desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) fijo a 37°C.
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El estuche debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión del especialista responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar las ropas protectoras adecuadas de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los estuches, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del sustrato a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el estuche a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar reactivos de diferentes lotes ni tampoco de diferentes estuches.
7. Comprobar que los reactivos no contienen precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al supervisor para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el estuche.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas luego de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del estuche usando puntas desechables y cambiándolas luego de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en el estuche e internamente en los reactivos. Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en estuches abiertos, en uso por un período de hasta 3 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.
13. Los desechos producidos durante el uso del estuche deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del estuche (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales

de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Las muestras deben estar identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Se recomienda el uso del código de barras.
3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.
6. Aquellas muestras donde la concentración de anticuerpos IgG anti-EBNA se sospeche mayor de 100 arbU/ml, deben ser diluidas 1:10 ó 1:100 en el Calibrador 0 arbU/ml. Las diluciones se recomienda hacerlas en un tubo desechable: 50 ul de la muestra + 450 ul del Cal 0 (1:10), luego 50 ul de la dilución 1:10 se diluye en 450 ul del Cal 0 (1:100). Agitar los tubos con ayuda del vórtex y proceder al paso de dilución según la sección M.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de conservación. De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas, deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C.

Nota importante: Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes, se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie de amarillo a verde.

Curva de Calibración:

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

Suero Control:

Añadir al polvo liofilizado, el volumen de agua de calidad ELISA indicado en la etiqueta. Dejar disolver completamente y luego mezclar cuidadosamente con el vórtex antes de usar.

Nota: Una vez reconstituida, la solución no es estable. Se recomienda mantenerla congelada en alícuotas a -20°C.

Solución de Lavado Concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada debe diluirse 20x con agua bidestilada y mezclarse suavemente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

Conjugado:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Diluyente de muestras:

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

Cromógeno/ Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Ácido Sulfúrico:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Leyenda:

Indicación de peligro, **Frases H**

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, **Frases P**

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL ESTUCHE.

1. Las micropipetas deben ser calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (etanol 70%, lejía 10%, de calidad de los desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%.
2. La incubadora de ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar

que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.

4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de ±5%.
5. El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro de 620-630nm, obligatorio para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda ≤ 10 b) Rango de absorbancia de 0 a ≥2.0, c) Linealidad ≥2.0, reproducibilidad ≥1%. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar la correcta medición de la densidad óptica, según las normas del fabricante.
6. En caso de usar un sistema automatizado de ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control de calidad interno". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y las de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos por contaminación de los pocillos adyacentes por muestras fuertemente reactivas. Se recomienda el uso de sistemas automatizados para el pesquaje en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.
7. El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el estuche, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

1. Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del estuche (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Compruebe que los componentes líquidos no están contaminados con partículas o agregados visibles.
3. Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico.
4. Compruebe que no han ocurrido rupturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
5. Disolver el Suero Control como se ha descrito anteriormente y mezclar suavemente.
6. Diluir totalmente la Solución de Lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
7. Dejar los componentes restantes alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.

8. Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y cebar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
9. Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
10. En caso de trabajar automáticamente, encender el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
11. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
12. Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
13. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al supervisor.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

El estuche puede ser utilizado tanto para la determinación cualitativa como cuantitativa.

M.1 Determinación Cuantitativa.

1. Diluir las muestras **1:101** dispensando en un tubo desechable 1 ml de Diluyente de Muestras y 10 µl de muestra, mezclar con ayuda de un vórtex, antes de usar. No diluir los Calibradores ya que están listos para el uso.
2. Poner el número necesario de tiras en el soporte plástico e identificar los pocillos de las muestras y de los estándares. Dejar los pocillos A1 y B1 vacíos para el blanco.
3. Dispensar 100µl de los Calibradores y 100µl del Suero Control por duplicado, luego dispensar 100µl de las muestras diluidas.
4. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.

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

5. Luego de la primera incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
6. Dispensar 100µl de Conjugado en todos los pocillos, excepto A1 y B1, controlar que los reactivos han sido correctamente añadidos.

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

7. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.
8. Lavar la microplaca, de igual forma que en el paso 5.
9. Dispensar 100µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluidos A1 y B1. Incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

10. Dispensar 100µl de Ácido Sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 9. Los pocillos correspondientes a las muestras positivas, el Suero Control y los Calibradores positivos deben cambiar de color azul a amarillo.
11. Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y, otro de 620-630 nm (substracción del fondo obligatorio), calibrando el instrumento con los pocillos A1 y B1 (blanco).

M.2 Análisis Cualitativo.

Para realizar la determinación cuantitativa, proseguir como se indica a continuación:

1. Diluir las muestras **1:101** dispensando en un tubo desechable (ej: 1 ml de Diluyente de Muestras y 10 µl de muestra), mezclar con ayuda de un vórtex, antes de usar. No diluir los Calibradores ya que están listos para el uso. Mexclar con ayuda de un vórtex.
2. Poner el número necesario de tiras en el soporte plástico e identificar los pocillos de las muestras y de los estándares. Dejar el pocillo A1 vacío para el blanco.
3. Dispensar 100 µl del Calibrador 0 arbU/ml por duplicado, 100 µl del Calibrador 10 arbU/ml por duplicado, 100 µl del Calibrador 100 arbU/ml, en simple. Dispensar 100 µl de las muestras en los pocillos correspondientes.
4. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.

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

5. Luego de la primera incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
6. Dispensar 100µl de Conjugado en todos los pocillos, excepto A1.

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

7. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.
8. Luego de la segunda incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
9. Dispensar 100µl de Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1. Incubar la microplaca, protegida de la luz, durante **20 minutos a temperatura ambiente (18-24°C)**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

10. Dispensar 100µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 9. Los pocillos correspondientes a las muestras positivas, el Suero Control y los Calibradores positivos deben cambiar de color azul a amarillo.
11. Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1.

Notas generales importantes:

1. Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO

Método	Operaciones
Calibradores & Control(*)	100 ul
Muestras diluidas 1:101	100 ul
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado	100 ul
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Mezcla TMB/H2O2	100 ul
3ª incubación	20 min
Temperatura	t.a.°
Acido Sulfúrico	100 ul
Lectura D.O.	450nm/620-630 nm

t.a.° = temperatura ambiente

(*) Notas importantes:

- El suero de control (CS) no afecta al cálculo de los resultados de la prueba.
- El suero de control (CS) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado en el análisis cuantitativo:

Microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	CAL4	M1									
B	BL	CAL4	M2									
C	CAL1	CAL5	M 3									
D	CAL1	CAL5	M 4									
E	CAL2	CAL6	M 5									
F	CAL2	CAL6	M 6									
G	CAL3	SC(*)	M 7									
H	CAL3	SC(*)	M 8									

Leyenda: BL = Blanco // CAL = Calibradores //

SC(*)= Suero Control - No obligatorio // M = Muestra

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado en el análisis cualitativo:

Microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M3	M11									
B	CAL1	M4	M12									
C	CAL1	M5	M13									
D	CAL3	M6	M14									
E	CAL3	M7	M15									
F	CAL6	M8	M16									
G	M1	M9	M17									
H	M2	M10	M18									

Leyenda: BL = Blanco // CAL = Calibradores // M = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza un grupo de pruebas con los calibradores cada vez que se usa el estuche para verificar si el procedimiento durante el ensayo se ha realizado correctamente.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Exigencia
Pocillo Blanco	< 0.100DO450nm
CAL 1 0 arbU/ml	< 0.150 DO450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación < 30%< 30%
CAL 2 5 arbU/ml	DO450nm > DO450nm CAL1 + 0.100
CAL 3 10 arbU/ml	DO450nm > DO450nm CAL1 + 0.200
CAL 6 100 arbU/ml	DO450nm > 1.000

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

En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe:

Problema	Compruebe que
Pocillo blanco > 0.100 DO450nm	la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
CAL 1 0 arbU/ml > 0.150 OD450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación > 30%	1.el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido cebado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores durante el dispensado de los calibradores. 4. no ha existido contaminación del Calibrador negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el Conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.

CAL 2 5 arbU/ml DO450nm <DO450nm CAL1 + 0.100	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el calibrador equivocado). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
CAL 3 10 arbU/ml DO450nm <DO450nm CAL1 + 0.200	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución. 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
CAL 6 100 arbU/ml < 1.000DO450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar una muestra equivocada). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.

Si se presenta alguno de los problemas anteriores, avisar al supervisor para tomar las medidas pertinentes.

** Notas

Si se ha usado suero de control, comprobar los siguientes datos:

Parámetro	Exigencia
Suero Control	valor medio de DO450nm CAL4 +/-20%

Si los resultados de la prueba no se corresponden con los requisitos indicados anteriormente, proceder del siguiente modo:

Problema	Compruebe que
Suero Control Diferente de establecidos	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar una muestra equivocada). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del suero.

En cualquier caso, si todos los demás parámetros (blanco, CAL1, CAL2, CAL3, CAL6) se corresponden con los requisitos establecidos, la prueba puede considerarse válida.

Nota importante:

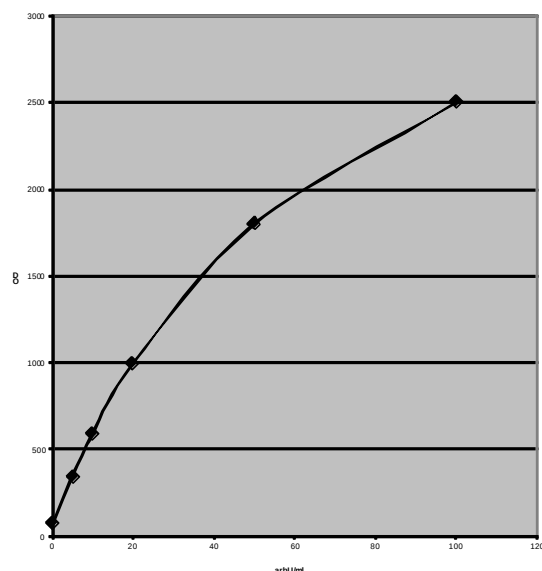
El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11.

P. RESULTADOS.

P.1 Método cuantitativo.

Si el ensayo resulta válido, usar para el método cuantitativo un programa de ajuste de curva para diseñar la curva de calibración con los valores obtenidos en la lectura a 450nm/620-630nm (se sugiere interpolar 4 parámetros). Luego calcular sobre la curva de calibración la concentración de anticuerpos IgG anti-EBNA presentes en la muestra.

A continuación, un ejemplo de curva de calibración:



Nota Importante:

No usar la curva anterior para formular los cálculos.

P.2 Método cualitativo.

En el método cualitativo, calcular los valores medios de DO450nm/620-630nm para los Calibradores 0 y 10 arbU/ml, luego comprobar que el ensayo es válido.

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

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

Calibrador 0 arbU/ml: 0.020 – 0.024 DO450nm
Valor medio: 0.022DO450nm
Menor de 0.150 – Válido
Calibrador 10 arbU/ml: 0.450 – 0.470DO450nm
Valor medio: 0.460DO450nm
Mayor de Cal 0 + 0.200 – Válido
Calibrador 100 arbU/ml: 2.045DO450nm
Mayor de 1.000 – Válido

La DO450nm/620-630nm del Calibrador 10 arbU/ml se considera el cut-off (Co) del sistema. La relación entre los valores de DO450nm/620-630nm de las muestras y los valores de DO450nm/620-630nm del Calibrador 10 arbU/ml (S/Co) permiten un estimado semicuantitativo de la cantidad de IgG contenida en la muestra.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Las muestras con una concentración menor de 5 arbU/ml se consideran negativas a IgG anti-EBNA EBV.

Las muestras con una concentración entre 5-10 arbU/ml se consideran en la zona gris, mientras que aquellas con una concentración mayor de 10 arbU/ml se consideran positivas a IgG anti-EBNA EBV.

Los resultados de esta prueba EBNA IgG, por si solos no son suficientes para establecer un diagnóstico efectivo. Es necesario combinarlos a la detección de IgM anti-VCA.

A continuación se muestra un esquema con los marcadores serológicos esenciales de la infección por Epstein-Barr (Infectious Diseases Handbook, 3ª ed. Lexi-Comp Inc., USA).

VCA IgM	EBNA IgG	Interpretación
negativo	negativo	No historia de infección por EBV
positivo	negativo	Infección primaria aguda
negativo	positivo	Historia de infección previa
positivo	positivo	Reactivación

Notas generales importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del supervisor del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
3. El diagnóstico debe ser evaluado y comunicado al paciente por un médico calificado.

R. PERFORMANCES.

La evaluación del performance ha sido realizada en un centro clínico externo, con vasta experiencia en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Han sido utilizados paneles con muestras negativas y positivas con referencia a un estuche comercial aprobado por FDA.

1. Límite de detección:

La Comunidad Europea no ha definido hasta el momento ningún estándar internacional para la detección de anticuerpos IgG anti-EBNA del EBV.

Para garantizar una sensibilidad óptima al sistema, ha sido preparado un Gold Standard Interno (IGS), derivado de un paciente en fase aguda de mononucleosis.

2. Sensibilidad y especificidad Diagnósticas:

Las microplacas están recubiertas con antígeno nativo EBNA purificado por afinidad, en grado de garantizar una alta especificidad.

La sensibilidad diagnóstica ha sido estudiada en más de 50 muestras, clasificadas como positivas mediante un estuche europeo de referencia. Las muestras positivas provienen de pacientes con la mononucleosis.

La especificidad diagnóstica ha sido determinada utilizando paneles con más de 50 muestras negativas provenientes de individuos sanos y donantes de sangre, clasificadas como negativas según el estuche de referencia. Lo mismo es válido para las muestras potencialmente interferentes.

Se emplearon además plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrate, EDTA y heparina) y suero humanos. No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

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

La evaluación del performance arrojó los siguientes valores:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	≥ 98 %

3. Reproducibilidad:

Se realizó un estudio con 3 muestras de reactividades a IgG anti-EBNA diferentes, examinadas en 16 réplicas, en tres corridas separadas, se obtuvo un CV de 5 a 20%, en dependencia de las lecturas de DO450nm/620-630nm.

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

S. LIMITACIONES.

Los falsos positivos fueron estimados como 2-5% de la población normal.

Las muestras que luego de ser descongeladas presentan partículas de fibrina o partículas agregadas, generan algunos resultados falsos positivos.

BIBLIOGRAFÍA.

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

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado conforme a la norma ISO 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

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



VCA IgG

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

- for "in vitro" diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italia**

Telefono +39 02 27007161

Fax +39 02 26007726

e-mail: info@diapro.it

VCA IgG

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the quantitative/qualitative determination of IgG antibodies to Epstein Barr Virus Capsidic Antigen in human plasma and sera.

For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

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

C. PRINCIPLE OF THE TEST

In order to get rid of crossreactions with other viruses of the same family, microplates are coated with affinity purified native VCA antigen, to provide the assay with the highest specificity and sensitivity.

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

After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti-VCA IgG are detected by the addition of anti HlgG antibody, labeled with peroxidase (HRP). The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti-VCA IgG antibodies present in the sample.

IgG in the sample may therefore be quantitated by means of a standard curve calibrated in arbitrary units per milliliter (arbU/ml) as no international standard is available.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

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

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

2. Calibration Curve: CAL N°...

6x2.0 ml/vial. Ready to use and color coded standard curve ranging: CAL1 = 0 arbU/ml // CAL2 = 5 arbU/ml // CAL3 = 10 arbU/ml // CAL4 = 20 arbU/ml // CAL 5 = 50 arbU/ml // CAL6 = 100 arbU/ml. Standards are calibrated against an internal Gold Standard or IGS as no international one is defined.

Contains human serum proteins, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.1% Kathon GC as preservatives. Standards are blue colored.

3. Control Serum: CONTROL ...m

1 vial. Lyophilized. It contains bovine serum proteins, human IgG antibodies to VCA at 20 arbU/ml±20%, 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.1% Kathon GC as preservatives.

3. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle20x concentrated solution. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.1% Kathon GC.

4. Enzyme conjugate : CONJ

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

5. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

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

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

6. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vialIt contains 0.3 M H₂SO₄ solution.
Attention !: Irritant (Xi R36/38; S2/26/30)

7. Specimen Diluent: DILSPE

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.1% Kathon GC as preservatives. To be used to dilute the sample.

8. Plate sealing foils n°2

9. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-borne microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
5. Upon receipt, store the kit at 2.8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample.
9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one.
10. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit did not pointed out any relevant loss of activity up to six 6 uses of the device and up to 6 months.
11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..
14. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water
16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or

microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

4. Sera and plasma can be stored at +2..8°C for up to five days after collection. For longer storage periods, samples can be stored frozen at -20°C for several months. Any frozen samples should not be freeze/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.

5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8µ filters to clean up the sample for testing.

6. Samples whose anti-VCA IgG antibody concentration is expected to be higher than 100 arbU/ml should be diluted before use, either 1:10 or 1:100 in the Calibrator 0 arbU/ml. Dilutions have to be done in clean disposable tubes by diluting 50 µl of each specimen with 450 µl of Cal 0 (1:10). Then 50 µl of the 1:10 dilution are diluted with 450 µl of the Cal 0 (1:100). Mix tubes thoroughly on vortex and then proceed toward the dilution step reported in section M.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of storing.

In this case call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back inside the aluminum pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2..8°C.

Important Note: After first opening, remaining strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

Calibration Curve

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

Control Serum

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilised powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex.

Note: The control after dissolution is not stable. Store frozen in aliquots at -20°C.

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8°C.

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

Sample Diluent

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

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Legenda: R 36/38 = Irritating to eyes and skin.

S 2/26/30 = In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/-0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The ELISA washer is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated and correctly optimised using the kit controls and reference panels, before using the kit for routine laboratory tests. Usually 4-5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350µl/well of washing solution = 1 cycle) are sufficient to ensure that the assay performs as expected. A soaking time of 20-30 seconds between cycles is suggested. In order to set correctly their number, it is recommended to run an assay with the kit controls and well characterized negative and positive reference samples, and check to match the values reported below in the section "Internal Quality Control". Regular calibration of the volumes delivered by, and maintenance (decontamination and cleaning of needles) of the washer has to be carried out according to the instructions of the manufacturer.
4. Incubation times have a tolerance of ±5%.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and ideally with a second filter (620-630nm) for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0; (c) linearity to ≥ 2.0; repeatability ≥ 1%. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dissolve the content of the Control Serum as reported.
6. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
7. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
8. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as found in the validation of the instrument for its use with the kit.
9. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
10. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
11. Check that the micropipettes are set to the required volume.
12. Check that all the other equipment is available and ready to use.
13. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

The kit may be used for quantitative and qualitative determinations as well.

M1. QUANTITATIVE DETERMINATION:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the A1 and B1 empty for the operation of blanking.
3. Dispense 100 µl of Calibrators and 100 µl Control Serum in duplicate. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
4. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

5. Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section I.3).
6. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except A1+B1 blanking wells, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1 and B1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

7. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
8. Wash microwells as in step 5.
9. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank wells A1 and B1 included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

10. Pipette 100 µl Sulphuric Acid to stop the enzymatic reaction into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
11. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and possibly at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1 or B1 or both.

M2. QUALITATIVE DETERMINATION

If only a qualitative determination is required, proceed as described below:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.
3. Dispense 100 µl of Calibrator 0 arbU/ml and Calibrator 5 arbU/ml in duplicate and Calibrator 100 arbU/ml in single. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
4. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

5. Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section I.3).
6. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the A1 well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

7. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
8. Wash microwells as in step 5.
9. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

10. Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from yellow to blue.
11. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and possibly at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

1. If the second filter is not available ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading at 450nm. Finger prints could generate false positive results on reading.
2. Reading has to be carried out just after the addition of the Stop Solution and anyway not any longer than 20 minutes after its addition. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to high background.

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Calibrators & Control	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	4-5 cycles
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	4-5 cycles
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm

An example of dispensation scheme for Quantitative Analysis is reported below:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S1									
B	BLK	CAL4	S2									
C	CAL1	CAL5	S3									
D	CAL1	CAL5	S4									
E	CAL2	CAL6	S5									
F	CAL2	CAL6	S6									
G	CAL3	CS	S7									
H	CAL3	CS	S8									

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrator
CS = Control Serum -S = Sample

An example of dispensation scheme in qualitative assays is reported below:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 3	S 11									
B	CAL1	S 4	S 12									
C	CAL1	S 5	S 13									
D	CAL2	S 6	S 14									
E	CAL2	S 7	S 15									
F	CAL6	S 8	S 16									
G	S1	S 9	S 17									
H	S2	S 10	S 18									

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrators
S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as qualified.

Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
CAL 1 0 arbU/ml	< 0.150 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
CAL 2 5 arbU/ml	OD450nm > OD450nm CAL1 + 0.100
CAL 6 100 arbU/ml	OD450nm > 1.000
Control Serum	20 arbU/ml +/-20%

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section. If they do not, do not proceed any further and operate as follows:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not got contaminated during the assay
CAL 1 0 arbU/ml > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive calibrator instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative calibrator or of their wells has occurred due spills of positive samples or the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

CAL 2 5 arbU/ml OD450nm < OD450nm CAL1 + 0.100	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (ex.: dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
CAL 6 100 arbU/ml < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.
Control Serum Different from 20 arbU/ml	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

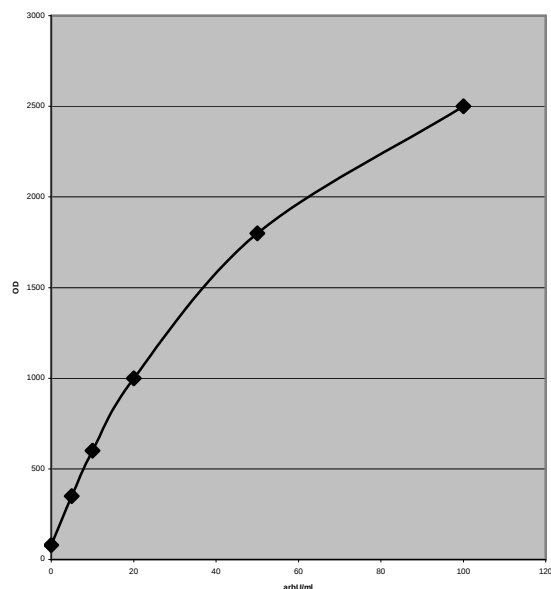
Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

P. RESULTS

P.1 Quantitative method

If the test turns out to be valid, use for the quantitative method an approved curve fitting program to draw the calibration curve from the values obtained by reading at 450nm (4-parameters interpolation is suggested). Then on the calibration curve calculate the concentration of anti VCA IgG antibody in samples.

An example of Calibration curve is reported below.



Important Note:

Do not use the calibration curve above to make calculations.

P.2 Qualitative method

In the qualitative method, calculate the mean OD450nm values for the Calibrators 0 and 5 arbU/ml and then check that the assay is valid.

Example of calculation:

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

Calibrator 0 arbU/ml: 0.020 – 0.024 OD450nm
Mean Value: 0.022 OD450nm
Lower than 0.150 – Accepted

Calibrator 5 arbU/ml: 0.250 – 0.270 OD450nm
Mean Value: 0.260 OD450nm
Higher than Cal 0 + 0.100 – Accepted

Calibrator 100 arbU/ml: 2.045 OD450nm
Higher than 1.000 – Accepted

The OD450nm of the Calibrator 5 arbU/ml is considered the cut-off (or Co) of the system.

The ratio between the OD450nm value of the sample and the OD450nm of the Calibrator 5 arbU/ml (or S/Co) can provide a semi-quantitative estimation of the content of specific IgG in the sample.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Samples with a concentration lower than 5 arbU/ml are considered negative for anti-VCA IgG antibody.

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

VCA IgG results alone are not, anyway, enough to provide a clear diagnosis of EBV infection. At least EBV VCA IgM results, possibly together with EBNA IgG, are necessary in combination. A reference range of the minimum essential serological markers of Epstein-Barr infection, derived from Infectious Diseases Handbook, 3rd edition, published by Lexi-Comp Inc., USA, is reported schematically below:

VCA IgM	EBNA (or VCA) IgG	Interpretation
negative	negative	No history of EBV infection
positive	negative	Acute primary infection
negative	positive	History of previous infection
positive	positive	Reactivation

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
3. Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted in an external clinical center on negative and positive samples with reference to a FDA approved commercial kit.

1. Limit of detection

No international standard for VCA IgG Antibody detection has been defined so far by the European Community. In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient with an history of past mononucleosis infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

Microplates are coated with with affinity purified native VCA antigen capable to provide the assay with the highest specificity and sensitivity.

The diagnostic performances were evaluated in a performance evaluation study conducted in an external centre, with excellent experience in the diagnosis of infectious diseases.

The diagnostic sensitivity was studied on more than 50 samples, pre-tested positive with a different reference kit of European origin in use at the laboratory. Positive samples were collected from patients that experienced mononucleosis infection.

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

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

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

The Performance Evaluation provided the following values :

Sensitivity	≥ 98 %
Specificity	≥ 98 %

3. Reproducibility:

Data obtained from a study conducted on three samples of different VCA IgG reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs show CV% values ranging 3-16% depending on OD450nm readings.

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

S. LIMITATIONS

False positivity has been assessed as less than 2-5% of the normal population depending on the reference kit used.

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

REFERENCES

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

Produced by
Dia.Pro. Diagnostic Bioprobes Srl.
via G.Carducci n°27 –Sesto San Giovanni (Mi) - Italy



VCA IgM

**“Capture” Enzyme ImmunoAssay
(ELISA) for the quantitative/qualitative
determination of IgM class antibodies to
Epstein Barr Virus Capsidic Antigen
in human plasma and sera**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl

Via Carducci n° 27

20099 – Sesto San Giovanni

Milano – Italy

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

VCA IgM

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the quantitative or qualitative determination of IgM class antibodies to Epstein Barr Virus (EBV) Capsidic Antigen in human plasma and sera with the "capture" system.

The kit is intended for the classification of the viral infective agent and the follow-up of EBV infected patients.

For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

Epstein Barr Virus or EBV is the principal etiological agent of infectious mononucleosis, as well as a contributory factor in the etiology of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma, or NPC.

A member of the family Herpesviridae, it has a worldwide distribution, such that 80 to 90% of all adults have been infected. Primary infections usually occur during the first decade of life. While childhood infections are mostly asymptomatic, 50 to 70% of young adults undergoing primary EBV infections show mild to severe illness.

EBV may cause a persistent, latent infection which can be reactivated under immunosuppression or in AIDS affected patients. As humoral responses to primary EBV infections are quite rapid, the level and class of antibodies raised in most cases allow classification as to whether the patient is still susceptible, has a current or recent primary infection, had a past infection or may be having reactivated EBV infection.

The detection of EBV-specific IgG, IgM and IgA antibodies to its major immunodominant antigens has become therefore an important and useful determination for the monitoring and follow-up of EBV infected patients.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

The assay is based on the "IgM Capture" method and on affinity purified native VCA antigen.

Microplates are coated with a polyclonal anti-IgM antibody that in the 1st incubation "captures" specifically this class of antibodies.

After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti EBV-VCA IgM are detected by the addition of a complex formed by biotinylated affinity purified native VCA antigen and Streptavidine, labelled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of IgM antibodies present in the sample and can be detected by an ELISA reader.

Quantification of IgM is made possible by a standard curve calibrated in arbitrary units, in absence of an international standard to refer to.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to carry out 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 breakable wells coated with affinity-purified anti human IgM specific (u-chain) goat polyclonal antibody and sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

2. Calibration Curve: CAL N° ...

Ready to use and color coded standard curve ranging:

4 ml CAL1 = 0 arbU/ml

4 ml CAL2 = 10 arbU/ml

2 ml CAL3 = 20 arbU/ml

2 ml CAL4 = 50 arbU/ml

4 ml CAL5 = 100 arbU/ml.

Standards are calibrated against an internal Gold Standard or IGS as no international one is defined.

Contains human serum proteins, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. Standards are blue colored.

3. Control Serum: CONTROL ...ml

1 vial. Lyophilized. Contains fetal bovine serum proteins, human anti EBV VCA IgM antibodies at $20 \pm 20\%$ arbU/ml, 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

Important Note: The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label.

3. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle. 20x concentrated solution.

Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0 +/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

4. Enzyme conjugate: CONJ 20X

1x0.8 ml/vial. 20x concentrated solution. It contains peroxidase (HRP) labeled Streptavidine, dissolved into a buffered solution of 10 mM Tris buffer pH 6.8 +/-0.1, 5% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

5. Antigen Diluent : AG DIL

n° 1 vial of 16 ml. Protein buffer solution for the preparation of the working EBV VC antigen. The solution contains 10 mM Tris buffer pH 6.8 +/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.2 mg/ml gentamicine sulphate as preservatives. The reagent is code coloured with 0.01% red alimentary dye

6. EBV VCA Antigen : Ag VCA

1x6 vials. Lyophilized reagent to be dissolved with 1.9 ml of Antigen Diluent as reported in the proper section. It contains biotinylated affinity purified native VCA antigen, 25 mM Tris buffer pH 7.8 +/-0.1 and 5% BSA as proteic carrier.

7. Specimen Diluent: DILSPE

2x60.0 ml/vial. Buffered solution for the dilution of samples. It contains 2% casein, 0.2 M Tris buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.2% Tween 20, 0.045% ProClin 300 and 0.09% sodium azide as preservatives. The component is blue color coded.

8. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

1x16ml/vial. Contains a 50 mM citrate-phosphate buffered solution at pH 3.5-3.8, 0.03% tetra-methyl-benzidine or TMB and 0.02% hydrogen peroxide of H₂O₂.

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

9. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vial. Contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

10. Plate sealing foils n° 2

11. Package insert n° 1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes in the range 10-1000 ul and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (double distilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.

4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator (dry or wet) set at +37°C.
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and if with 620-630nm (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen/Substrate (TMB/H₂O₂) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
5. Upon receipt, store the kit at +2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures.
8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
10. Do not use the kit after the expiration date stated on external (primary container) and internal (vials) labels.
11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. The use of disposable plastic labware is recommended in the preparation of the washing solution or in transferring components into other containers of automated workstations, in order to avoid contamination.
13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..
14. Accidental spills have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water.

16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND RECOMMENDATIONS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate.
3. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
4. Haemolysed (red) and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.
5. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
6. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-uses of the device and up to 3 months.

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant has not turned dark green, indicating a defect in storing.

In this case, call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back inside the aluminum pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°..8°C.

Important Note: After first opening, remaining strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

Calibration Curve

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Control Serum:

Lyophilized reagent to be dissolved with EIA grade water as reported in the label.

Note: In order to maintain its reactivity fully preserved, upon dissolution keep the excess frozen in aliquots at -20°C and use just once. Do not freeze again.

Wash buffer concentrate:

The whole content of the 20x concentrated solution has to be diluted with bidistilled water up to 1200 ml and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

Antigen-Conjugate Complex:

Proceed carefully as follows:

1. Dissolve the content of a lyophilized vial with 1.9 ml of Antigen Diluent. Let fully dissolved the lyophilized content and then gently mix on vortex.
2. Gently mix the concentrated Enzyme Conjugate on vortex. Then add 0.1 ml of it to the vial of the dissolved EBV VC Ag and mix gently on vortex.

Important Notes:

1. *Dissolve and prepare only the number of vials necessary to the test. The complex obtained is not stable. Store any residual solution frozen in aliquots at -20°C.*
2. *The preparation of the complex has to be done **right before** the dispensation of samples and controls into the plate. Mix again on vortex gently just before its use.*

Specimen Diluent

Ready to use. Mix on vortex before use.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. Do not expose to strong light, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, and if possible, sterile disposable container.

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (70% ethanol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample or the components of the kit. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of $\pm 2\%$.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of $\pm 0.5^\circ\text{C}$) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right

dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution.

The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).

5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.

An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.

4. Incubation times have a tolerance of $\pm 5\%$.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0 ; (c) linearity to ≥ 2.0 ; repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer 's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, shaking, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing samples and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells due to strongly reactive samples, leading to false positive results. The use of ELISA automated work stations is recommended for blood screening and when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure full compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen/Substrate is colorless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container).
5. Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
6. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
7. Dissolve the Control Serum as described above and gently mix.
8. Prepare the Antigen/Conjugate complex as reported before.
9. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.

- Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
- Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
- If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
- Check that the micropipettes are set to the required volume.
- Check that all the other equipment is available and ready to use.
- In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

Two procedures can be carried out with the device according to the request of the clinician.

M.1 Quantitative analysis

- Place the required number of strips in the microplate holder. Leave A1 and B1 wells empty for the operation of blanking. Store the other strips into the bag in presence of the desiccant at 2..8°C, sealed.
- Dilute samples 1:101 dispensing 1 ml Specimen Diluent into a disposable tube and then 10 ul sample; mix on vortex before use. Do not dilute the calibrators and the control serum as they are ready-to-use.
- Prepare the Antigen/Conjugate complex as reported in Section H.
- Pipette 100 µl of all the Calibrators and 100 µl of Control Serum in duplicate; then dispense 100 µl of samples. The Control Serum is used to verify that the whole analytical system works as expected. Check that Calibrators Control Serum and samples have been correctly added. Then incubate the microplate at +37°C for 60 min.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil only when the test is performed manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- Wash the microplate as reported in section I.3.
- In all the wells, except A1 and B1, pipette 100 µl Antigen/ Conjugate Complex. Check that the reagent has been correctly added. Incubate the microplate at +37°C for 60 minutes.

Important note: Be careful not to touch the inner surface of the well with the pipette tip when dispensing the Complex. Contamination might occur.

- Wash the microplate as described in section I.3.
- Pipette 100 µl TMB/H₂O₂ mixture in each well, the blank wells A1+B1 included. Check that the reagent has been correctly added. Then incubate the microplate at room temperature for 20 minutes.

Important note: Do not expose to strong direct light as a high background might be generated.

- Stop the enzymatic reaction by pipette 100 µl Sulphuric Acid into each well and using the same pipetting sequence as in step 7. Then measure the color intensity with a microplate reader at 450nm (reading) and at 620-630nm (blanking, mandatory), blanking the instrument on A1, or B1 or both wells.

M.2 Qualitative analysis

- Place the required number of strips in the microplate holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking. Store the other strips into the bag in presence of the desiccant at 2..8°C, sealed.

- Dilute samples 1:101 dispensing 1 ml Specimen Diluent into a disposable tube and then 10 ul sample; mix on vortex before use. Do not dilute the calibrators as they are ready-to-use.
- Prepare the Antigen/Conjugate complex as reported in Section H.
- Pipette 100 µl CAL 1 in duplicate, 100 µl CAL 2 in duplicate, 100 µl CAL 5 in single. Then dispense 100 µl of samples. Check that Calibrators and samples have been correctly added. Then incubate the microplate at +37°C for 60 min.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil only when the test is performed manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- Wash the microplate as reported in section I.3.
- In all the wells, except A, pipette 100 µl Antigen/ Conjugate Complex. Check that the reagent has been correctly added. Incubate the microplate at +37°C for 60 minutes.

Important note: Be careful not to touch the inner surface of the well with the pipette tip when dispensing the Complex. Contamination might occur.

- Wash the microplate as described in section I.3.
- Pipette 100 µl TMB/H₂O₂ mixture in each well, the blank well A1 included. Check that the reagent has been correctly added. Then incubate the microplate at room temperature for 20 minutes.

Important note: Do not expose to strong direct light as a high background might be generated.

- Stop the enzymatic reaction by pipette 100 µl Sulphuric Acid into each well and using the same pipetting sequence as in step 7. Then measure the color intensity with a microplate reader at 450nm (reading) and at 620-630nm (blanking, mandatory), blanking the instrument on A1.

Important general notes:

- Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.
- Reading has should ideally be performed immediately after the addition of the Stop Solution but definitely no longer than 20 minutes afterwards. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to a higher background.

N. ASSAY SCHEME

Calibrators	100 ul
Control Serum (*)	100 ul
Samples diluted 1:101	100 ul
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme Conjugate	100 ul
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H ₂ O ₂ mix	100 ul
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm/620-630nm

(*) Important Notes:

- The Control Serum (CS) it does not affect the test's results calculation.
- The Control Serum (CS) used only if a laboratory internal quality control is required by the Management.

An example of dispensation scheme in quantitative assays is reported below:

Microplate												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S3									
B	BLK	CAL4	S4									
C	CAL1	CAL5	S5									
D	CAL1	CAL5	S6									
E	CAL2	CS(*)	S7									
F	CAL2	CS(*)	S8									
G	CAL3	S1	S9									
H	CAL3	S2	S10									

Legenda: BLK = Blank // CAL = Calibrators // S = Sample//
CS = Control Serum - Not mandatory

An example of dispensation scheme in qualitative assays is reported below:

Microplate												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2	S10									
B	CAL1	S3	S11									
C	CAL1	S4	S12									
D	CAL2	S5	S13									
E	CAL2	S6	S14									
F	CAL5	S7	S15									
G	S1	S8	S16									
H	S2	S9	S17									

Legenda: BLK = Blank // CAL = Calibrators // S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the calibrators any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as qualified.

Control that the following data are matched:

Parameters	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm
Calibrator 1 0 arbU/ml	< 0.200 OD450nm after blanking
Calibrator 2 10 arbU/ml	OD450nm higher than the OD450nm of CAL 1 + 0.100
Calibrator 5 100 arbU/ml	> 1.000 OD450nm
Coefficient of variation	< 30% for the Calibrator 1

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

If they do not, do not proceed any further and perform the following checks:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not become contaminated during the assay
CAL 1 OD450nm > 0.200	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study;
coefficient of variation > 30%	2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure when the dispensation of calibrators is carried out; 4. that no contamination of the Cal 1 or of the

	wells where it was dispensed has occurred due to spills of positive samples or Antigen/Conjugate complex; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the Antigen/Conjugate complex 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
CAL 2 OD450nm < Cal 1 + 0.100	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution (ex.: dispensation of a wrong calibrator); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
CAL 5 OD450nm < 1.000	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution; 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibration has occurred.

**** Note:**

If Control Serum has used, verify the following data:

Check	Requirements
Control Serum	OD450nm = OD450nm CAL 20 arbU/ml +/-20%

If the results of the test doesn't match the requirements stated above, operate as follows:

Problem	Check
Control Serum Different from Expected value	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution (e.g.: dispensation of a wrong calibrator); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the control has occurred.

Anyway, if all other parameters (Blank, CAL1, CAL2, CAL 5), match the established requirements, the test may be considered valid.

Important note:

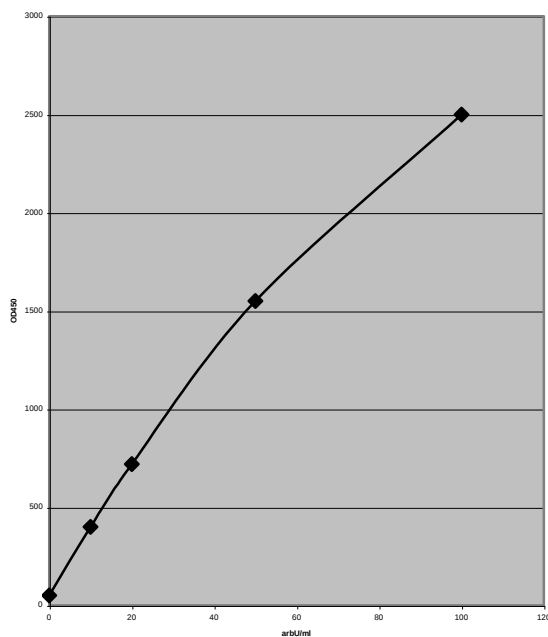
The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 9.

P. RESULTS

P.1 Quantitative method

If the test turns out to be valid, use the quantitative method an approved curve fitting program to draw the calibration curve from the values obtained by reading at 450nm/620-630nm (4-parameters interpolation is suggested).
Then on the calibration curve calculate the concentration of anti EBV VCA IgM antibody in samples.

An example of Calibration curve is reported below.



Note: Do not use these data to calculate the real assay results. The figures above are reported only as an example.

P.2 Qualitative method

Check that the assay is valid.

An example is provided below:

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the reading step described in the section M, point 9):

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

Calibrator 0 arbU/ml: 0.020 – 0.024 OD450nm
Mean Value: 0.022 OD450nm
Lower than 0.200 – Accepted
Calibrator 10 arbU/ml: 0.250 – 0.270 OD450nm
Mean Value: 0.260 OD450nm
Higher than CAL 1 + 0.100 – Accepted
Calibrator 100 arbU/ml: 2.045 OD450nm
Higher than 1.000 – Accepted

The OD450nm/620-630nm of the Calibrator 10 arbU/ml is considered the cut-off (or Co) of the system.

The ratio between the OD450nm/620-630nm value of the sample and the OD450nm/620-630nm of the Calibrator 10 arbU/ml (or S/Co) can provide a semi-quantitative estimation of the content of specific IgM in the sample.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Samples with a concentration lower than 10 arbU/ml are considered negative for anti EBV VCA IgM antibody.

Samples with a concentration higher than 10 arbU/ml are considered positive for anti EBV VCA IgM antibody. The patient is likely to be in the acute phase of infection (mononucleosis).

VCA IgM results alone are not, anyway, enough to provide a clear diagnosis of EBV infection. At least EBNA IgG results are necessary in combination.

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

VCA IgM	EBNA IgG	Interpretation
negative	negative	No history of EBV infection
positive	negative	Acute primary infection
negative	positive	History of previous infection
positive	positive	Reactivation

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
3. Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted in an external clinical center on panels of negative and positive samples with reference to a commercial kit.

1. Limit of detection

No international standard for EBV VCA IgM Antibody detection has been defined so far by the European Community.

In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient in the acute phase of mononucleosis infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The assay is based on the "IgM Capture" method and on affinity purified native VCA antigen in order to provide the highest specificity and sensitivity.

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

The diagnostic specificity was determined on panels of more than 250 negative samples from normal individuals and blood donors, classified negative with the reference kit, including potentially interfering specimens.

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

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

The Performance Evaluation provided the following values :

Sensitivity	> 98 %
Specificity	> 98 %

3. Reproducibility:

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

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

S. LIMITATIONS

False positivity has been assessed as less than 2 % of the normal population, mostly due to high titers of Rheumatoid Factor. IgM capture systems, even if acknowledged to be more specific than sandwich assays, may in fact be influenced by this kind of interfering substance.

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

T. CONFIRMATION TEST

In order to provide the medical doctor with the best accuracy in testing for EBV infection, a confirmation assay is reported.

The confirmation test has to be carried out on any positive sample before a diagnosis of primary infection of EBV is released to the doctor.

Proceed for confirmation as follows:

1. Prepare the Antigen/Conjugate Complex as described in the proper section.
2. The well A1 of the strip is left empty for blanking.
3. CAL 2 (10 arbU/ml) is dispensed in the strip in positions B1+C1.
4. The positive sample to be confirmed, diluted 1:101, is dispensed in the strip in position D1+E1.
5. The strip is incubated for 60 min at +37°C.
6. After washing, the blank well A1 is left empty.
7. 100 µl of Antigen/Conjugate Complex are dispensed in wells B1+C1+D1.
8. Then 100 µl of Enzyme Conjugate (CONJ) alone are added to well E1. **Note:** This material does not contain any VCA antigen, only the conjugate
9. The strip is incubated for 60 min at +37°C.
10. After washing, 100 µl Chromogen/Substrate are added to all the wells and the strip is incubated for 20 min at r.t.
11. 100 µl Sulphuric Acid are added to all the wells and then their color intensity is measured at 450nm (reading filter) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

Interpretation of results is carried out as follows:

1. If the sample in position D1 shows an OD450nm/620-630nm lower than the one of CAL 2, a problem of dispensation or contamination in the first test is likely to be occurred. The Assay Procedure in Section M has to be repeated to double check the analysis.
2. If the sample in position D1 shows an OD450nm/620-630nm value higher than the one of CAL 2 and in position E1 shows an OD450nm/620-630nm value still higher than the one of CAL 2, the sample is considered a **false positive**. The reactivity of the sample is in fact not dependent on the specific presence of EBV VCA antigens and a crossreaction with the enzyme conjugate has occurred.
3. If the sample in position D1 shows an OD450nm/620-630nm value higher than the one of CAL 2 and in position E1 shows an OD450nm/620-630nm value lower than the one of CAL 2, the sample is considered a **true positive**. The reactivity of the sample is in fact dependent on the specific presence of EBV VCA antigens and not due to any crossreaction with the conjugate alone.

The following table is reported for the interpretation of results:

Well	OD450nm/620-630nm		
D1	< CAL 2	> CAL 2	> CAL 2
E1	< CAL 2	> CAL 2	< CAL 2
Interpretation	Problem of contam.	False positive	True positive

REFERENCES

1. Evans AS and Niederman JC, Am J Clin Pathol, 1982, 77(5): 555-60
2. Fleisher GR, Collins M and Fager S, J Clin Microbiol, 1983, 17(4): 619-24
3. Howitz CA, Henle G et al., Am J Med, 1977, 63(6): 947-57.
4. Straus SE, Cohen JL, Tosato G et al., Ann Intern Med, 1993, 118(1): 45-58
5. Engvall E. and Perlmann P.. J. Immunochemistry, 8, 871-874, 1971
6. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol. 109, 129-135, 1971
7. Volk W.A.. In "Essential of Medical Microbiology". 2nd ed. pp 729, G.B.Lippincott Company, Philadelphia, New York, S.Josè, Toronto.
8. Betts R.F. and al.. Journal of Infectious Diseases, 143:821-826, 1981.
9. Engelhard D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 163:628-630, 1991.
10. Griffiths P.D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 145. 647-653, 1982
11. Kraat Y.J. et al.. Journal of Clin.Microbiol.. 30: 522-524, 1992.
12. Landini M.P. et al.. Eur.J.Clin.Microbiol.. 8: 159-163, 1989

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System in compliance with ISO 13485 rule. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

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



VCA IgM

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA)
de “captura” para la determinación
cualitativa/cuantitativa de anticuerpos
IgM al antígeno de la Cápside
del Virus Epstein Barr
en plasma y suero humanos**

- Uso exclusivo para diagnóstico “in vitro” -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
Milán - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF VCAM.CE
96 pruebas

VCA IgM

A. OBJETIVO DEL ESTUCHE.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa/cuantitativa de anticuerpos IgM al Antígeno de la Cápside(VCA) del Virus Epstein Barr (EBV), en plasma y suero humanos, mediante un sistema de "captura".

El estuche ha sido concebido para la clasificación del agente viral así como para el seguimiento de pacientes infectados con EBV.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN.

El Virus Epstein Barr (EBV) es considerado el principal agente etiológico de la Mononucleosis Infecciosa, así como del Linfoma de Burkitt y del Carcinoma Nasofaríngeo. Perteneciente a la familia *Herpesviridae* y está ampliamente distribuido en el mundo, se estima que entre un 80 y un 90% de los adultos estén infectados con el virus. Las infecciones primarias ocurren generalmente en la primera década de vida. Mientras en la infancia son en su mayoría asintomáticas, el 50-70% de los adultos jóvenes con infecciones primarias puede desarrollar de formas leves a severas de la enfermedad.

EBV causa infecciones latentes que pueden reactivarse en condiciones de inmunodepresión (personas inmunocomprometidas o pacientes SIDA). Debido a que la respuesta humoral a la infección primaria por EBV es bastante rápida, los niveles de anticuerpos presentes, así como la clase de los mismos, permiten determinar si un paciente es susceptible, si presenta una infección primaria reciente, en curso, o si está ocurriendo una reactivación de la infección por EBV.

La detección de anticuerpos IgG, IgM e IgA específicos contra los antígenos inmunodominantes del virus, constituye una herramienta importante para el monitoreo de pacientes infectados por EBV.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El análisis se basa sobre el método de "Captura IgM" y sobre antígeno nativo VCA purificado por afinidad,

Las microplacas están recubiertas con un anticuerpo policlonal anti-IgM que captura los anticuerpos de esta clase presentes en la muestra.

Luego del lavado que elimina el resto de los componentes de la muestra, en la segunda incubación los anticuerpos IgM anti VCA de EBV inmovilizados en la fase sólida son detectados mediante un complejo compuesto por el antígeno nativo VCA purificado por afinidad, biotinilados y estreptavidina marcada con peroxidasa (HRP).

Posteriormente se añade la mezcla cromógeno/substrato, la cual se combina con la enzima conjugada unida a la fase sólida, dando lugar a una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgM presentes en la muestra, detectable mediante un lector ELISA.

La cuantificación de los anticuerpos IgM, en ausencia de un estándar internacional de referencia, es posible con ayuda de una curva estándar de calibración.

D. COMPONENTES.

Cada estuche contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLATE

12 tiras x 8 pocillos intercambiables recubiertos con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgM humano específico (cadena u) y purificado por afinidad. Las microplacas están almacenadas en bolsas selladas con desecante y deben ser

puestas a temperatura ambiente antes de abrirlas, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y almacenar a 4°C.

2. Curva de Calibración: CAL N° ...

Listo para el uso. Curva estándar con código de color:

4 ml CAL1 = 0 arbU/ml

4 ml CAL2 = 10 arbU/ml

2 ml CAL3 = 20 arbU/ml

2 ml CAL4 = 50 arbU/ml

4 ml CAL 5 = 100 arbU/ml.

Los estándares han sido calibrados contra un Gold Standard interno (IGS), ya que no se ha definido uno internacional.

Contiene proteínas del suero humano, 2% de caseína, tampón citrato de sodio 10 mM pH 6+/-0.1, 0.1% de Tween 20, así como azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como preservativos. La Curva de Calibración está codificada con el color azul.

3. Suero Control: CONTROL ...ml

1 vial. Liofilizado. Contiene suero fetal bovino, anticuerpos IgM humanos anti VCA de EBV a $20 \pm 20\%$ arbU/ml, 0.2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 0.045% como preservativos.

Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del vial varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen correcto reportado en la etiqueta.

4. Tampón de Lavado Concentrado: WASHBUF 20X

1x60ml/botella. Solución concentrada 20x.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 6.0+/- 0.1, Tween 20 al 0.05% y ProClin 300 al 0.045%.

5. Conjugado: CONJ 20X

1x0.8 ml/vial. Solución concentrada 20x. Contiene estreptavidina marcada con peroxidasa (HRP), disuelta en tampón Tris 10 mM pH 6.8+/-0.1, BSA 5%, además de sulfato de gentamicina 0.02 % y ProClin 300 0.045% como preservativos.

6. Diluyente de Antígeno: AG DIL

n° 1 vial de 16 ml. Solución tamponada proteica para la preparación del antígeno VC EBV. Contiene tampón Tris 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, 2% de BSA, además de 0.2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 0.045% como preservativos. El reactivo está codificado con el color rojo (0.01% de colorante rojo).

7. Antígeno VCA EBV : Ag VCA

1x6 viales. Reactivo liofilizado para disolver en 1.9 ml de Diluyente del Antígeno, según se indica más adelante. Contiene antígeno nativo VCA purificado por afinidad, tampón Tris HCl 25 mM pH 7.8+/-0.1 además de 0.5 de BSA como soporte proteico.

8. Diluyente de muestras DILSPE

2x60ml. Solución tamponada proteica para la dilución de las muestras. Contiene 2% de caseína, tampón Tris 0.2 M a pH 6.0 +/- 0.1, 0.2% de Tween 20, además de azida sódica al 0.09% y 0.045% de ProClin 300 como preservativos.

El reactivo está codificado con el color azul.

9. Cromógeno/Substrato SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato-fosfato 50mM pH 3.5-3.8, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02% así como dimetilsulfóxido 4%.

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

10. Ácido Sulfúrico: H2SO4 0.3M

1x15ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0.3M

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

11. Sellador adhesivo, n° 2

12. Manual de instrucciones, n° 1

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (rangos de 10 a 1000 µl) y puntas plásticas desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) fijo a 37°C.
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El estuche debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión del especialista responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar las ropas protectoras adecuadas de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los estuches, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del sustrato a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el estuche a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar reactivos de diferentes lotes ni tampoco de diferentes estuches.
7. Comprobar que los reactivos no contienen precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al supervisor para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el estuche.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas luego de cada uso. No reutilizar puntas desechables
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del estuche usando puntas desechables y cambiándolas luego de cada uso. No reutilizar puntas desechables
10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en el estuche e internamente en los reactivos. Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en estuches abiertos, en uso por un período de hasta 6 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.

13. Los desechos producidos durante el uso del estuche deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del estuche (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Evitar adicionar conservantes a las muestras, especialmente azida sódica, ya que pueden afectar la actividad enzimática del conjugado.
3. Las muestras deben estar identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Se recomienda el uso del código de barras.
4. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
5. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
6. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Estudios de estabilidad realizados en estuches en uso (hasta 6 veces) no han arrojado pérdida de actividad significativa en un período de 3 meses.

Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de conservación. De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas, deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C.

Nota importante: Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes, se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie de amarillo a verde.

Curva de Calibración:

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

Suero Control:

Reactivo liofilizado. Disolver en agua de calidad ELISA según el volumen indicado en la etiqueta.

Nota: Para preservar la reactividad se recomienda mantenerlo congelado en alícuotas a -20°C . No recongelar.

Solución de Lavado Concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada debe diluirse 20x con agua bidestilada hasta alcanzar 1200 ml y mezclarse suavemente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre $+2$ y 8°C .

Complejo Antígeno-Conjugado:

Proceder cuidadosamente según se indica:

1. Disolver el contenido de un vial liofilizado utilizando 1.9 ml de Diluyente Antígeno. Dejar disolver completamente y luego mezclar cuidadosamente con el vórtex.
2. Mezclar el Conjugado concentrado con ayuda del vórtex. Añadir luego 0.1 ml del mismo al vial del Ag EBV VC disuelto y mezclar suavemente en el vórtex.

Notas Importantes:

1. Disolver y preparar solamente los viales necesarios para la prueba. El inmunocomplejo obtenido no es estable. Almacenar la solución sobrante en alícuotas a -20°C .
2. La preparación del inmunocomplejo debe realizarse justo antes de dispensar las muestras y los controles en la placa. Mezclar nuevamente en vórtex justo antes de usar.

Diluyente de muestras:

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

Cromógeno/ Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Ácido Sulfúrico:

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

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

Leyenda:

Indicación de peligro, **Frases H**

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, **Frases P**

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL ESTUCHE.

1. Las micropipetas deben ser calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (alcohol 70%, lejía 10%, de calidad de los desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de $\pm 2\%$. Deben descontaminarse periódicamente los residuos de los componentes del estuche.
2. La incubadora de ELISA debe ser ajustada a 37°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ de tolerancia) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 μl /pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.
4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de $\pm 5\%$.
5. El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro de 620-630nm, mandatory para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda $\leq 10\text{nm}$ b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2.0 , c) Linealidad ≥ 2.0 , reproducibilidad $\geq 1\%$. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar la correcta medición de la densidad óptica, según las normas del fabricante.
6. En caso de usar un sistema automatizado de ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos por contaminación de los pocillos adyacentes por muestras fuertemente reactivas. Se recomienda el uso de sistemas automatizados para el pesquaje en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.
7. El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar

en combinación con el estuche, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

1. Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del estuche (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Compruebe que los componentes líquidos no están contaminados con partículas o agregados visibles.
3. Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico.
4. Compruebe que no han ocurrido rupturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte.
5. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
6. Diluir totalmente la Solución de Lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
7. Disolver el Suero Control como se ha descrito anteriormente y mezclar suavemente.
8. Preparar el Complejo Antígeno/Conjugado según se reporta anteriormente.
9. Dejar los componentes restantes alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
10. Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y cebar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
11. Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
12. En caso de trabajar automáticamente, encender el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
13. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
14. Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
15. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al supervisor.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

Pueden ser realizados dos tipos de procedimiento de acuerdo a los requerimientos clínicos.

M.1 Análisis Cuantitativo.

1. Poner el número necesario de tiras en el soporte plástico e identificar los pocillos de las muestras y de los estándares. Dejar los pocillos A1 y B1 vacíos para el blanco. Almacenar a 2..8°C las tiras sobrantes en la bolsa, selladas con el desecante.
2. Diluir las muestras **1:101** dispensando en un tubo desechable 1 ml de Diluyente de Muestras y 10 µl de muestra, mezclar con ayuda de un vórtex, antes de usar. No diluir los Calibradores y el Suero Control disuelto ya que están listos para el uso.
3. Preparar el Complejo Antígeno/Conjugado según se indica en la sección H.
4. Dispensar 100µl de los Calibradores y 100µl del Suero Control por duplicado, luego dispensar 100µl de las muestras diluidas. El Suero Control se emplea para verificar que el sistema analítico funcione como es debido. Comprobar que el Suero Control, los Calibradores y las muestras han sido

añadidos adecuadamente. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C.**

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

5. Luego de la primera incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
6. Dispensar 100µl de Conjugado en todos los pocillos, excepto A1 y B1, controlar que los reactivos han sido correctamente añadidos. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C.**

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

7. Luego de la segunda incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
8. Dispensar 100µl de Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluidos los del blanco. Controlar que los reactivos han sido correctamente añadidos. Incubar la microplaca durante **20 minutos a temperatura ambiente.**

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias

9. Dispensar 100µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso. Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con los pocillos A1 y B1 (blanco).

M.2 Análisis Cualitativo.

1. Poner el número necesario de tiras en el soporte plástico e identificar los pocillos de las muestras y de los estándares. Dejar el pocillo A1 vacío para el blanco. Almacenar a 2-8°C las tiras sobrantes en la bolsa, selladas con el desecante.
2. Diluir las muestras **1:101** dispensando en un tubo desechable 1 ml de Diluyente de Muestras y 10 µl de muestra, mezclar con ayuda de un vórtex, antes de usar. No diluir los Calibradores y el Suero Control disuelto ya que están listos para el uso.
3. Preparar el Complejo Antígeno/Conjugado según se indica en la sección H.
4. Dispensar 100 µl del Calibrador 1 por duplicado, 100 µl del Calibrador 2 por duplicado, 100 µl del Calibrador 5 simple. Dispensar 100 µl de las muestras en los pocillos correspondientes. Comprobar que los Calibradores y las muestras han sido añadidos adecuadamente. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C.**

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

5. Luego de la primera incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
6. Dispensar 100µl de Complejo Antígeno/Conjugado en todos los pocillos, excepto A1. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C.**

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

7. Luego de la segunda incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).

8. Dispensar 100µl de Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1. Controlar que los reactivos han sido correctamente añadidos. Incubar la microplaca durante **20 minutos a temperatura ambiente**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

9. Dispensar 100µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 7. Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección 1.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1.

Notas generales importantes:

- Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
- La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO

Calibradores	100 µl
Suero Control(*)	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Conjugado	100 µl
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Cromógeno/Substrato	100µl
3ª incubación	20 min
Temperatura	t.a.°
Acido Sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450nm/620-630nm

t.a.° = temperatura ambiente

(*) Notas importantes:

- El suero de control (CS) no afecta al cálculo de los resultados de la prueba.
- El suero de control (CS) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado en el análisis cuantitativo:

Microplaca												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	CAL4	M 3									
B	BL	CAL4	M 4									
C	CAL1	CAL5	M 5									
D	CAL1	CAL5	M 6									
E	CAL2	SC(*)	M 7									
F	CAL2	SC(*)	M 8									
G	CAL3	M1	M 9									
H	CAL3	M2	M10									

Leyenda: BL = Blanco // CAL = Calibradores
SC(*)= Suero Control - No obligatorio // M = Muestra

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado en el análisis cualitativo:

Microplaca												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M3	M 11									
B	CAL1	M4	M 12									
C	CAL1	M5	M 13									
D	CAL2	M6	M 14									
E	CAL2	M7	M 15									
F	CAL5	M8	M 16									
G	M1	M9	M 17									
H	M2	M10	M 18									

Leyenda: BL = Blanco // CAL = Calibradores // M = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza un grupo de pruebas con los controles cada vez que se usa el estuche para verificar si el procedimiento durante el ensayo se ha realizado correctamente.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Exigencia
Pocillo Blanco	< 0.100 DO450nm
Calibrador 1 0 arbU/ml	< 0.200 DO450nm después de leer el blanco
Calibrador 2 10 arbU/ml	DO450nm mayor que DO450nm del CAL 1 + 0.100
Calibrador 5 100 arbU/ml	> 1.000 DO450nm
Coefficiente de variación	< 30% para el Calibrador 1

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

En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe:

Problema	Compruebe que
Pocillo blanco DO450nm > 0.100	la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
CAL 1 DO450nm > 0.200 Coefficiente de variación > 30%	- el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. - se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido cebado con la misma antes del uso. - no se han cometido errores durante el dispensado de los calibradores. - no ha existido contaminación del Cal 1 o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. - las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el Complejo Antígeno/Cconjugado. - las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.

CAL 2 DO450nm < Cal 1 + 0.100	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el calibrador equivocado). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
CAL 5 DO450nm < 1.000	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución. 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.

Si se presenta alguno de los problemas anteriores, avisar al supervisor para tomar las medidas pertinentes.

**** Nota**

Si se ha usado suero de control, comprobar los siguientes datos:

Parámetro	Exigencia
Suero Control	DO450nm = DO450nm del CAL 20 arbU/ml +/-20%

Si los resultados de la prueba no se corresponden con los requisitos indicados anteriormente, proceder del siguiente modo:

Problema	Compruebe que
Suero Control	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar una muestra equivocada). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del suero.
Diferente de establecidos	

En cualquier caso, si todos los demás parámetros (blanco, CAL1, CAL2, CAL5) se corresponden con los requisitos establecidos, la prueba puede considerarse válida.

Nota importante:

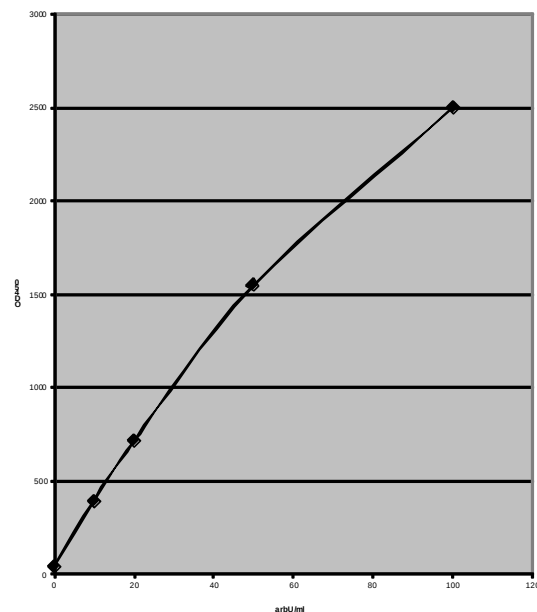
El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 9.

P. RESULTADOS.

P.1 Método cuantitativo.

Si el ensayo resulta válido, usar para el método cuantitativo un programa de ajuste de curva para diseñar la curva de calibración con los valores obtenidos en la lectura a 450nm/620-630nm (se sugiere interpolar 4 parámetros). Luego calcular sobre la curva de calibración la concentración de anticuerpos IgM anti-VCA EBV presentes en la muestra.

A continuación, un ejemplo de curva de calibración:



Nota importante:

No usar la curva anterior para formular los cálculos.

P.2 Método cualitativo.

Comprobar que el ensayo es válido.

A continuación, un ejemplo de los cálculos a realizar (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 9).

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

Calibrador 0 arbU/ml: 0.020 – 0.024 DO450nm
Valor medio: 0.022 DO450nm
Menor de 0.200 – Válido
Calibrador 10 arbU/ml: 0.250 – 0.270 DO450nm
Valor medio: 0.260 DO450nm
Mayor de CAL 1 + 0.100 – Válido

Calibrador 100 arbU/ml: 2.045 DO450nm
Mayor de 1.000 – Válido

La DO450nm/620-630nm del Calibrador 10 arbU/ml se considera el cut-off (Co) del sistema.

La relación entre los valores de DO450nm/620-630nm de las muestras y los valores de DO450nm/620-630nm del Calibrador 10 arbU/ml (S/Co) permiten un estimado semicuantitativo de la cantidad de IgM contenida en la muestra.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Las muestras con una concentración menor de 10 arbU/ml se consideran negativas a IgM anti-VCA EBV.

Las muestras con una concentración mayor de 10 arbU/ml se consideran positivas a IgM anti-VCA EBV. El paciente probablemente se encuentra en la fase aguda de la infección (mononucleosis).

Los resultados de la prueba para la detección de IgM anti-VCA, por si solos no son suficientes para establecer un diagnóstico efectivo. Es necesario combinarlos a la detección de IgG EBNA. A continuación se muestra un esquema con los marcadores serológicos esenciales de la infección por Epstein-Barr (Infectious Diseases Handbook, 3ª ed. Lexi-Comp Inc., USA).

VCA IgM	EBNA IgG	Interpretación
negativo	negativo	No historia de infección por EBV
positivo	negativo	Infección primaria aguda
negativo	positivo	Historia de infección previa
positivo	positivo	Reactivación

Notas generales importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del supervisor del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
3. El diagnóstico debe ser evaluado y comunicado al paciente por un médico calificado.

R. PERFORMANCES.

La evaluación del performance ha sido realizada en un centro clínico externo utilizando paneles con muestras negativas y positivas y un estuche comercial de referencia.

1. Límite de detección.

La Comunidad Europea no ha definido hasta el momento ningún estándar internacional para la detección de anticuerpos IgM contra el Antígeno de la Cápside del EBV. Para garantizar una sensibilidad óptima al sistema, ha sido preparado un Gold Standard Interno (IGS), derivado de un paciente en fase aguda de mononucleosis.

2. Sensibilidad y especificidad Diagnósticas:

El análisis se basa sobre el método de "Captura IgM" y sobre antígeno nativo VCA purificado por afinidad en grado de garantizar al ensayo la máxima sensibilidad e especificidad.

La sensibilidad diagnóstica ha sido estudiada en más de 50 muestras, clasificadas como positivas mediante un estuche europeo de referencia. Las muestras positivas provienen de pacientes en la fase aguda de la mononucleosis.

La especificidad diagnóstica ha sido determinada utilizando paneles con más de 250 muestras negativas provenientes de individuos sanos y donantes de sangre, clasificadas como negativas según el estuche de referencia. Lo mismo es válido para las muestras potencialmente interferentes.

Se emplearon además plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrato, EDTA y heparina) y suero humanos. No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

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

La evaluación del performance arrojó los siguientes valores:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

3. Reproducibilidad:

Se realizó un estudio con 3 muestras, examinadas en 16 réplicas, en tres corridas separadas, se obtuvo un CV de 2 a 8%, en dependencia de las lecturas de DO450nm/620-630nm. La variabilidad mostrada en las tablas no dió como resultado una clasificación errónea de las muestras.

S. LIMITACIONES.

Los falsos positivos fueron estimados como menos del 2% de la población normal, debido mayormente a altos títulos de Factor Reumatoide. El sistema de captura de IgM, aún cuando se ha demostrado más específico que el sistema "sandwich", puede verse afectado por estas sustancias interferentes.

Las muestras que luego de ser descongeladas presentan partículas de fibrina o partículas agregadas, generan algunos resultados falsos positivos.

T. PRUEBA DE CONFIRMACIÓN.

Se ejecuta esta prueba con el propósito de garantizar a los médicos la mayor precisión del ensayo en la detección del EBV. La misma debe realizarse a cada una de las muestras positivas, antes de emitir un diagnóstico de infección primaria por EBV.

Proceder para la confirmación como sigue:

1. Preparar el Complejo Antígeno/Conjugado según se indica en la sección H.
2. Dejar vacío el pocillo A1 para el blanco.
3. Dispensar el CAL 2 (10 arbU/ml) en las posiciones B1+C1.
4. Diluir la muestra positiva 1:101 y dispensarla en la posición D1+E1.
5. Incubar la tira 60 minutos a +37°C.
6. Luego del lavado el pocillo A1 para el blanco queda vacío.
7. Dispensar 100 µl de Complejo Antígeno/Conjugado en los pocillos B1+C1+D1.
8. Adicionar al pocillo E1 100 µl de Conjugado (**CONJ**).
Nota: Este material no contiene antígenos VCA, solo el conjugado.
9. Incubar la tira 60 minutos a +37°C.
10. Adicionar, luego del lavado, 100 µl de Cromógeno/Substrato en todos los pocillos e incubar 20 minutos a r.t.
11. Dispensar 100µl de Ácido Sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

La interpretación de los resultados se realiza de la siguiente forma:

1. Si la muestra en posición D1 tiene un valor de DO450nm/620-630nm menor del valor del CAL 2, probablemente en el primer ensayo haya ocurrido un error en el dispensado o alguna contaminación. Debe repetirse el Procedimiento del Ensayo, sección M.
2. Si la muestra en posición D1 tiene un valor de DO450nm/620-630nm mayor del valor del CAL 2, y en posición E1 el valor de DO450nm/620-630nm es todavía mayor que el del CAL 2, la muestra se considera un **falso positivo**. La reactividad de la muestra, en este caso, no depende de la presencia específica de antígenos VCA EBV, por lo que probablemente ha ocurrido una reacción cruzada con la enzima conjugada.
3. Si la muestra en posición D1 tiene un valor de DO450nm/620-630nm mayor del valor del CAL 2, y en posición E1 el valor de DO450nm es menor que el del CAL 2, se considera **realmente positiva**. La reactividad de la muestra, en este caso se debe a la presencia específica de antígenos VCA EBV y no a reacciones cruzadas.

En la siguiente tabla se muestra la interpretación de los resultados:

Pocillo	DO450nm		
D1	< CAL 2	> CAL 2	> CAL 2
E1	< CAL 2	> CAL 2	< CAL 2
Interpretación	Probl. de contam.	Falso positivo	Realmente positivo

BIBLIOGRAFÍA.

1. Evans AS and Niederman JC, Am J Clin Pathol, 1982, 77(5): 555-60
2. Fleisher GR, Collins M and Fager S, J Clin Microbiol, 1983, 17(4): 619-24
3. Howitz CA, Henle G et al., Am J Med, 1977, 63(6): 947-57.
4. Straus SE, Cohen JL, Tosato G et al., Ann Intern Med, 1993, 118(1): 45-58
5. Engvall E. and Perlmann P.. J. Immunochemistry, 8, 871-874, 1971
6. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol. 109, 129-135, 1971
7. Volk W.A.. In "Essential of Medical Microbiology". 2nd ed. pp 729, G.B.Lippincott Company, Philadelphia, New York, S.José, Toronto.
8. Betts R.F. and al.. Journal of Infectious Diseases, 143:821-826, 1981.
9. Engelhard D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 163.628-630, 1991.
10. Griffiths P.D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 145. 647-653, 1982
11. Kraat Y.J. et al.. Journal of Clin.Microbiol.. 30: 522-524, 1992.
12. Landini M.P. et al.. Eur.J.Clin.Microbiol.. 8: 159-163, 1989

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado conforme a la norma ISO 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:

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



ВЕКТОР



Лямблия-антитела-ИФА-БЕСТ

D-3552

Набор реагентов
для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов классов А, М, G
к антигенам лямблий
в сыворотке (плазме) крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Утверждена 21.07.2011
приказом Росздравнадзора № 4449-Пр/11



1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Лямблия-антитела-ИФА-БЕСТ предназначен для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов классов А (IgA), М (IgM), G (IgG) к антигенам лямблий в сыворотке (плазме) крови.

1.2. Лямблиоз – часто встречающееся паразитарное заболевание тонкого кишечника человека, вызываемое *Ciardia lamblia* – представителем семейства *Protozoe*. Лямблии существуют в двух отдельных формах – цистах (статическая форма) и трофозоитах (пролиферативная форма).

1.3. Заражение человека происходит оральным путем, при попадании цист лямблий в желудочно-кишечный тракт. Источник инвазии – некипяченая питьевая вода, вода водоемов, немытые фрукты и овощи, грязные руки и контакт с домашними животными.

Традиционно диагностика лямблиоза проводится микроскопическим методом по обнаружению цист или трофозоитов в образцах фекалий или дуоденальном содержимом.

Дополнительным методом диагностики лямблиоза является иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на обнаружении в крови инвазированного антител, специфичных к антигенам лямблий.

Определение иммуноглобулинов различных классов к антигенам лямблий целесообразно дополнительно включать в комплексное обследование де-

тей с аллергическими симптомами, дерматитами, с гастродуоденитами, а также часто болеющих детей. Это способствует более надежному выявлению лямблиозной инвазии, позволяет своевременно провести специфическое лечение и в последующем осуществить контроль его эффективности.

1.4. Набор рассчитан на проведение 96 анализов образцов сыворотки (плазмы) крови, включая контроли, или 12 независимых постановок ИФА по 8 определений, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения суммарных антител к антигенам лямблий представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ. Специфическими компонентами набора реагентов являются антигены лямблий, иммобилизованные в лунках планшетов, конъюгат моноклональных антител к IgA, IgM, IgG человека с пероксидазой хрена, положительный и отрицательный контрольные образцы.

На первой стадии анализа при взаимодействии исследуемых образцов сывороток крови в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами лямблий происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген–антитело» на поверхности лунок. После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки и добавления в лунки планшета конъюгата моноклональных антител к IgA, IgM, IgG человека с пероксидазой

хрена происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс. После второй отмывки количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм, референс-волна в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации суммарных антител к антигенам лямблий в анализируемом образце сыворотки.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антигенами лямблий, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, содержащий IgA, IgM, IgG к антигенам лямблий, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, не содержащий IgA, IgM, IgG к антигенам лямблий, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител к IgA, IgM, IgG человека с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,5 мл);

- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10,0 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленками для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночками для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 5–200 мкл – 16 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Перекрестные реакции при описторхозе, токсокарозе, эхинококкозе, трихинеллезе, аскаридозе не выявлены.

3.2. Специфическая активность

Чувствительность выявления иммуноглобулинов классов А, М, G к антигенам лямблий – со-

ответствие результатов выявления набором IgA, IgM, IgG к антигенам лямблий требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-134), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с положительными сыворотками больше либо равны величине диагностического значения оптической плотности.

Специфичность выявления иммуноглобулинов классов А, М, G к антигенам лямблий – соответствие результатов выявления набором IgA, IgM, IgG к антигенам лямблий требованиям стандартной панели предприятия (рег. № 05-2-134), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с отрицательными сыворотками меньше либо равны величине диагностического значения оптической плотности, умноженного на 0,85.

3.3. Титр стандартного образца предприятия СОП+ (рег. № 05-2-17), аттестованного ОБТК АО «Вектор-Бест», должен быть не менее 1:800.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попа-

дания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как в состав набора входят компоненты крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на каче-

ство ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 мкл до 200 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования;
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная;

- флаконы вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес. Допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови. После размораживания образцы тщательно перемешать.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25°C в течение времени не менее 60 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Неиспользованные стрипы можно хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление рабочего буферного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный рабочий буферный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток.

7.4. Подготовка положительного (K^+) и отрицательного (K^-) контрольных образцов

Контрольные образцы готовы к использованию. Перед использованием встряхнуть.

Контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.5. Предварительное разведение исследуемых образцов

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток (РПРС) и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешать. При этом темно-красный цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, ИФА данного образца может дать неправильный результат. При разведении плазмы цвет раствора в лунке меняется незначительно.

Предварительно разведенные исследуемые образцы можно хранить при температуре от 18 до 25°C не более 3 ч.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовится в отдельном чистом флаконе или в пластиковой ванночке для реагента из концентрата конъюгата и рабочего буферного раствора не более, чем за 5–10 мин до окончания первой инкубации.

Рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25°C не более 3 ч.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во одновременно используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбен- зидина		Рабочий буфер- ный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мл	РБР, мл	ТМБ, концентрат, мл	СБР, мл	ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистил. вода, мл
1	0,1	1,0	0,05	1,0	2,0	до 50
2	0,2	2,0	0,10	2,0	4,0	до 100
3	0,3	3,0	0,15	3,0	6,0	до 150
4	0,4	4,0	0,20	4,0	8,0	до 200
5	0,5	5,0	0,25	5,0	10,0	до 250
6	0,6	6,0	0,30	6,0	12,0	до 300
7	0,7	7,0	0,35	7,0	14,0	до 350
8	0,8	8,0	0,40	8,0	16,0	до 400
9	0,9	9,0	0,45	9,0	18,0	до 450
10	1,0	10,0	0,50	10,0	20,0	до 500
11	1,1	11,0	0,55	11,0	22,0	до 550
12	1,2	12,0	0,60	12,0	24,0	до 600

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

7.7. Приготовление рабочего раствора ТМБ

Готовится в отдельном чистом флаконе или в пластиковой ванночке для реагента из кон-

центрата ТМБ и СБР не более, чем за 5–10 мин до окончания первой инкубации.

Рабочий раствор ТМБ можно хранить при температуре от 18 до 25°C не более 3 ч.

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор ТМБ.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Внимание! *Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.*

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

7.9. Внесение контрольных образцов.

В лунку А-1 внести 100 мкл положительно-го контрольного образца (K^+). В лунки В-1 и С-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-).

7.10. Внесение исследуемых образцов сыворотки (плазмы).

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл

предварительно разведенных исследуемых образцов (п. 7.5.), тщательно перемешать.

Для повышения достоверности результатов исследуемые образцы рекомендуется анализировать в дублях, используя для каждого образца по две лунки.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 5–7 мин.

7.10.1. Определение титра исследуемых образцов.

При определении титра антители тестирование исследуемых образцов произвести в семи последовательных двукратных разведениях в интервале от 1:100 до 1:12800. В соответствующие лунки горизонтального ряда А внести по 180 мкл РРС и по 20 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (п. 7.5.), тщательно перемешать. В соответствующие лунки рядов В–Н внести по 100 мкл РРС. Каждый образец титровать, перенося по 100 мкл раствора из лунок предыдущего ряда в лунки последующего от А до Н, тщательно перемешивая пипетированием. После раститровки из каждой лунки последнего ряда Н удалить в дезинфицирующий раствор по 100 мкл раствора, оставляя в лунках по 100 мкл.

7.11. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.12. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного

устройства промыть лунки планшета 5 раз рабочим буферным раствором (п. 7.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого цикла промывки.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

Оставшийся после проведения ИФА рабочий раствор конъюгата из флакона или пластиковой ванночки удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором.

7.14. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.15. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет, как указано в п. 7.12.

7.16. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора ТМБ (см п. 7.7.).

Для внесения рабочего раствора ТМБ использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

Планшет инкубировать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25°C.

Оставшийся после проведения ИФА рабочий раствор ТМБ удалить из стеклянного флакона или пластиковой ванночки в сосуд с дезинфицирующим раствором.

7.17. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 5 мин после остановки реакции.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом (ОП_{ср.}К⁻).

9.2. Среднее значение ОП в лунках с К⁻ не должно превышать 0,30 ед. опт. пл.

Значение ОП в лунке с К⁺ должно быть не менее, чем 0,80 ед. опт. пл.

9.3. Только при соблюдении положений п. 9.2. можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.4. На основании полученных данных вычислить диагностическое значение оптической плотности (ОП_Д).

$$\text{ОП}_Д = \text{ОП}_{\text{ср. К}^-} + 0,2$$

9.5. Результат анализа считается **положительным**, если $\text{ОП}_{\text{обр.}} \geq \text{ОП}_Д$.

Результат анализа считается **отрицательным**, если $\text{ОП}_{\text{обр.}} \leq 0,85 \times \text{ОП}_Д$.

где ОП_{обр.} – оптическая плотность в лунке с анализируемым образцом сыворотки (плазмы) крови.

Результат анализа считается **сомнительным**, если $0,85 \times \text{ОП}_Д < \text{ОП}_{\text{обр.}} < \text{ОП}_Д$. Рекомендуется повторно провести иммуноферментный анализ данного образца.

9.6. За титр положительной сыворотки (плазмы) принимают ее наибольшее разведение, при котором оптическая плотность образца $\text{ОП}_{\text{обр.}} \geq \text{ОП}_Д$.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности (9 мес). Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности набора:

- неиспользованные стрипы после первого вскрытия пакета можно хранить в закрытом на замок пакете при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, субстратный буферный раствор, раствор для разведения сывороток, раствор для предварительного разведения сывороток, концентрат конъюгата, концентрат тетраметилбензидина и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- положительный и отрицательный контрольные образцы можно хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- рабочий буферный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток;
- рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25°C не более 3 ч;
- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить при температуре от 18 до 25°C не более 3 ч.

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.5. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, СБР, РПРС, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

**По вопросам, касающимся качества набора
«Лямблия-антитела-ИФА-БЕСТ»,
обращаться в АО «Вектор-Бест»
по адресу:**

630559, Новосибирская область,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58,
тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Все реагенты наборов, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

Антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют.

Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности.

Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации иммуноглобулинов классов А, М и G в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

1. Гарантийные обязательства

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

2. Обеспечение безопасности персонала

Обращение с материалами, контактирующими с исследуемыми образцами

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать в соответствии п. 4.7 настоящей инструкции и согласно МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998).

Порядок утилизации или уничтожения компонентов набора

При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиНом 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

3. Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

- не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

- ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором субстрата;

- избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

- рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

- никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и рабочего раствора ТМБ;

- перед отбором ТМБ из флакона необходимо обрабатывать конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флаконов с СБР и ТМБ;

- если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

– Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.

– Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

– Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.

– Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

– Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

4. Оценка анализа по коэффициенту позитивности

Результаты анализа можно оценить по коэффициенту позитивности (КП), рассчитывая отношение ОП в лунке с образцом пациента относительно ОП_Д. (п. 9.4.).

Для расчета коэффициента позитивности образцов, имеющих $ОП_{450} \leq 3,5$ о.е., использовать формулу:

$$КП_{обр.} = \frac{ОП_{450\text{ обр.}}}{ОП_{д}},$$

где $ОП_{450\text{ обр.}}$ – ОП образца, полученная в двухволновом режиме **450 / 620–655** нм (или только с фильтром **450 нм**).

Для расчета коэффициента позитивности образцов, имеющих $ОП_{450} > 3,5$ о.е., использовать формулу:

$$КП_{обр.} = 3,2 \times \frac{ОП_{450\text{ обр.}}}{ОП_{д}},$$

где $ОП_{405\text{ обр.}}$ – ОП образца, полученная в двухволновом режиме **405 / 620–655** нм (или только с фильтром **405 нм**).

Результат анализа **положительный**, если $КП_{обр.} \geq 1$, где $КП_{обр.}$ – коэффициент позитивности исследуемого образца.

Результат анализа **отрицательный**, если $КП_{обр.} \leq 0,85$.

Результат анализа **сомнительный**, если соответствующее ему значение $КП_{обр.}$ попадает в интервал от 0,85 до 1,0.

Расчет КП целесообразно проводить для оценки концентрации специфических антител в исследуемых образцах и при наблюдении за изменением концентрации сумарных антител к антигенам лямблий в динамике в парных образцах сывороток.

5. Диагностическая значимость полученных результатов

Лямблии обитают в проксимальном отделе тонкой кишки, поэтому для лямблиоза характерно развитие местных иммунологических реакций. Однако и в сыворотках крови инвазированных лямблиями людей выявляются антитела к антигенам лямблий, относящиеся к различным классам иммуноглобулинов. Показано, что попадание антигенов лямблий в периферическую кровь увеличивается при резорбции слизистой оболочки кишечника, проницаемость которой, как известно, возрастает при ее воспалении. В связи с этим выявление антител к антигенам лямблий в сыворотке крови может свидетельствовать о наличии патологического процесса.

**6. Краткая схема проведения ИФА
для набора реагентов
«Лямблия-антитела-ИФА-БЕСТ»**

*Использовать только после тщательного
ознакомления с инструкцией!*

- Внести:** по 100 мкл K^+ и K^- ;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл
предварительно разведенных
анализируемых образцов.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** рабочим буферным раствором,
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора
конъюгата.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** рабочим буферным раствором,
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл рабочего раствора
тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная
длина волны 620–655 нм.

7. Графические символы

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до ...		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 363-35-56.

01.02.19.

АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»

Международный сертификат ISO 13485

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru

www.vector-best.ru

БЕКТОР



Аскарида-IgG-ИФА-БЕСТ

D-3452

Набор реагентов
для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса G
к антигенам *Ascaris lumbricoides*
в сыворотке (плазме) крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Утверждена 12.04.2013

Приказом Росздравнадзора № 1390-Пр/13



1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Аскарида-IgG-ИФА-БЕСТ (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G к антигенам *Ascaris lumbricoides* в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Выявление иммуноглобулинов класса G к антигенам *Ascaris lumbricoides* может быть использовано для диагностики аскаридоза.

1.3. Набор рассчитан на проведение 96 определений, включая контрольные образцы, допускается 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения IgG к антигенам *Ascaris lumbricoides* представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ, в ходе которого при взаимодействии исследуемых образцов сывороток крови в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами аскарид происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген-антитело» на поверхности лунок.

После добавления в лунки планшета конъюгата происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс. Комплекс «антиген-антитело-конъюгат» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата

пероксидазы — перекиси водорода и хромогена —тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgG к антигенам *Ascaris lumbricoides* в анализируемом образце сыворотки (плазмы) крови.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антигенами *Ascaris lumbricoides*, готовый для использования — 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, содержащий иммуноглобулины класса G к антигенам *Ascaris lumbricoides*, готовый для использования — 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, не содержащий иммуноглобулины класса G к антигенам *Ascaris lumbricoides*, готовый для использования — 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, готовый для использования — 1 флакон (13 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) — 1 флакон (28 мл);
- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) — 1 флакон (10 мл);

- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 флакон (12 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночкой для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 5–200 мкл – 16 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Возможен перекрест иммунологических реакций при заболеваниях описторхозом, токсокарозом, трихинеллезом и эхинококкозом, что может быть связано как с совместной инвазией, так и с взаимодействием антител с гетерологичным антигеном за счет иммунологических перекрестов между антигенами.

3.2. Специфическая активность:

чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G к антигенам *Ascaris lumbricoides* – соответствие результатов качественного выявления набором иммуноглобулинов класса G

к антигенам *Ascaris lumbricoides* требованиям стандартной панели предприятия СПП (рег. № 05-2-216), аттестованной ОБТК АО «Вектор-бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с положительными сыворотками №1–№8 больше либо равны величине диагностического значения оптической плотности ($ОП_{№1-№8} \geq ОП_{д}$);

специфичность выявления иммуноглобулинов класса G к антигенам *Ascaris lumbricoides* – соответствие результатов качественного выявления набором иммуноглобулинов класса G к антигенам *Ascaris lumbricoides* требованиям стандартной панели предприятия СПП (рег. № 05-2-216), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с отрицательными сыворотками №9–№16 меньше либо равны величине диагностического значения оптической плотности, умноженного на 0,85 ($ОП_{№9-№16} \leq 0,85 \times ОП_{д}$).

3.3. Титр стандартного образца предприятия СОП⁺ (рег. № 05-2-215) должен быть не менее 1:800.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим

действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г. и в методических указаний МУ-287-113-00 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998 г).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как исследуемые образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционного, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны

быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–650 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 до 300 мкл;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы стеклянные вместимостью 10–15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес.

Следует избегать многократного замораживания / оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.3. Образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить

центрифугованием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при температуре от 18 до 25°C не менее 1 ч.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимые для проведения анализа количество стрипов. Использовать в течение 1 ч после установки. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток.

7.4. Подготовка положительного (K⁺) и отрицательного (K⁻) контрольных образцов

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Положительный и отрицательный контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности.

7.5. Предварительное разведение исследуемых образцов

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток (РПРС) и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешать. При разведении сыворотки красный цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат.

Предварительно разведенные исследуемые образцы можно хранить при температуре от 18 до 25°C не более 3 ч.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во исполь- зуемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
			ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистил. вода, мл
1	1,0	1,0	2,0	до 50
2	2,0	2,0	4,0	до 100
3	3,0	3,0	6,0	до 150
4	4,0	4,0	8,0	до 200
5	5,0	5,0	10,0	до 250
6	6,0	6,0	12,0	до 300
7	7,0	7,0	14,0	до 350
8	8,0	8,0	16,0	до 400
9	9,0	9,0	18,0	до 450
10	10,0	10,0	20,0	до 500
11	11,0	11,0	22,0	до 550
12	12,0	12,0	24,0	до 600

7.6. Подготовка конъюгата

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА раствор конъюгата утилизировать **(не сливать во флакон с исходным конъюгатом!)**.

Конъюгат после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента поместить в защищенное от света место.

Оставшийся после проведения ИФА раствор тетраметилбензидина утилизировать (**не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ!**).

Раствор ТМБ после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

7.9. Внесение образцов

В лунку А-1 внести 100 мкл положительно-го контрольного образца (K^+). В лунки В-1 и С-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-).

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток (PPC) и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых

образцов сыворотки (плазмы) крови (см п. 7.5.), перемешать пипетированием.

Раствор для разведения сывороток перед употреблением встряхнуть!

7.10. Определение титра исследуемых образцов

Внесение исследуемых сывороток для определения титра произвести в семи последовательных двукратных разведениях в интервале от 1:100 до 1:12800. В лунки горизонтального ряда А внести по 180 мкл РРС и по 20 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови (см п. 7.5.). В лунки рядов В–Н внести по 100 мкл РРС. Каждый образец титровать, перенося по 100 мкл раствора из лунок предыдущего ряда в лунки последующего от А до Н, тщательно перемешивая пипетированием. После раститровки из каждой лунки последнего ряда Н удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором по 100 мкл раствора, оставляя в лунках по 100 мкл.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10 мин.

7.11. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.12. По окончании инкубации снять липкую пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором

и промыть, добавляя во все лунки по 400 мкл промывочного раствора (см п. 7.3.). Процесс промывки повторить еще 4 раза. Общее количество отмывок равно 5. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата.

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.14. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$.

7.15. По окончании инкубации промыть планшет как описано в п. 7.12.

7.16. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

Планшет инкубировать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25°C .

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.17. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение оптической плотности при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху).

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср}K^-$); для каждой пары лунок, содержащих образцы исследуемых сывороток (плазмы) и последовательные разведения исследуемых сывороток (плазмы) крови.

9.2. На основании полученных данных вычислить диагностическое значение оптической плотности ($ОП_d$) по формуле:

$$ОП_d = ОП_{ср} (K^-) + 0,25,$$

где: $ОП_{ср} (K^-)$ – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом, ед. опт. плотн.

9.3. Оценка результатов:

— значение оптической плотности в лунках с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,80 ед. опт. плотн.;

— среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,25 ед. опт. плотн.

9.4. Только при соблюдении положений п. 9.3. можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.5. Результат анализа считают **положительным**, если $ОП_{обр} \geq ОП_{д}$.

Результаты анализа считают **отрицательным**, если $ОП_{обр} \leq 0,85 \times ОП_{д}$.

Результаты анализа считают **сомнительными**, если $ОП_{д} > ОП_{обр} > 0,85 \times ОП_{д}$,

где: $ОП_{обр}$ — оптическая плотность анализируемого образца в лунке, ед. опт. плотн.

При получении сомнительного результата рекомендуется повторно, через 2–4 недели, проанализировать вновь взятый образец сыворотки (плазмы) крови человека. Если оптическая плотность второго анализа снова будет в интервале от $0,85 \times ОП_{д}$ до $ОП_{д}$ — результат следует считать **отрицательным**.

9.6. Титр анализируемого образца сыворотки (плазмы) крови — наибольшее разведение анализируемого образца, при котором его оптическая плотность больше либо равна величине диагностического значения оптической плотности ($ОП_{обр} \geq ОП_{д}$).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8°C. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности.

В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности;
- положительный и отрицательный контрольные образцы, конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор для разведения сывороток и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности;

– промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток.

10.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.6. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор для предварительного разведения сывороток), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

**По вопросам, касающимся качества набора
«Аскарида-IgG-ИФА-БЕСТ»,**

следует обращаться в АО «Вектор-БЕСТ»

по адресу:

630559, Новосибирская область,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 363-20-60, 227-75-43,
тел./факс (383), 363-13-46, 363-35-55.
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ
ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ**

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Все реагенты наборов, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

Антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют.

Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности.

Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации IgG к антигенам *Ascaris lumbricoides* в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

Обеспечение безопасности персонала

Обращение с материалами, контактирующими с исследуемыми образцами

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать в соответствии п. 4.7. настоящей инструкции и согласно МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998).

Порядок утилизации или уничтожения компонентов набора

При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиНом 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

2. Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

- не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

- ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором ТМБ;

- избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

- рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

- никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

- перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо протереть конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона;

- если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

- Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.

- Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

- Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости

в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.

— Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

— Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

3. Гарантийные обязательства

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

4. Оценка анализа по коэффициенту позитивности

Результаты анализа можно оценить по коэффициенту позитивности (КП), рассчитывая отношение ОП в лунке с образцом пациента относительно ОП_д (п. 9.2.).

*В случае необходимости оценки результатов по коэффициенту позитивности провести повторное измерение ОП в режиме: основной фильтр – **405 нм**, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение без использования референс-фильтра.*

Для расчета коэффициента позитивности образцов, имеющих $ОП_{450} \leq 3,5$ о.е., использовать формулу:

$$КП_{обр.} = \frac{ОП_{450 \text{ обр.}}}{ОП_{450 \text{ д}}},$$

где ОП_{450 обр.} – ОП образца, полученная в двухволновом режиме **450 / 620–655 нм** (или только с фильтром **450 нм**).

Для расчета коэффициента позитивности образцов, имеющих $ОП_{450} > 3,5$ о.е., использовать формулу:

$$КП_{обр.} = 3,2 \times \frac{ОП_{405 \text{ обр.}}}{ОП_{450 \text{ д}}},$$

где ОП_{405 обр.} – ОП образца, полученная в двухволновом режиме **405 / 620–655 нм** (или только с фильтром **405 нм**).

Результат анализа **положительный**, если $KП_{обр.} \geq 1$, где $KП_{обр.}$ – коэффициент позитивности исследуемого образца.

Результат анализа **отрицательный**, если $KП_{обр.} \leq 0,85$.

Результат анализа **сомнительный**, если соответствующее ему значение $KП_{обр.}$ попадает в интервал от 0,85 до 1,0.

Расчет КП целесообразно проводить для оценки концентрации специфических антител в исследуемых образцах и при наблюдении за изменением концентрации IgG к антигенам *Ascaris lumbricoides* в динамике в парных образцах сывороток.

5. Диагностическая значимость полученных результатов

Интерпретацию результатов ИФА анализа проводит лечащий врач с учетом клинических признаков и результата копрологии обследуемых лиц. Следует учитывать возможность перекреста иммунологических реакций при заболеваниях описторхозом, токсокарозом, трихинеллезом и эхинококкозом. Это может быть связано как с совместной инвазией, так и со взаимодействием антител с гетерологичным антигеном за счет иммунологических перекрестов между антигенами.

**6. Краткая схема проведения ИФА
для набора реагентов
«Аскарида-IgG-ИФА-БЕСТ»**

*Использовать только после тщательного
ознакомления с инструкцией!*

- Внести:** по 100 мкл K^+ и K^- ;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл
предварительно разведенных
исследуемых сывороток.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором,
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором,
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора тетраме-
тилбензидина.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная
длина волны 620–655 нм.

7. Графические символы

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до ...		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 363-35-56.

29.04.19

АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»

Международный сертификат ISO 13485

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru

www.vector-best.ru

БЕКТОР



Токсокара-IgG-ИФА-БЕСТ

D-2752

Набор реагентов
для иммуноферментного выявления
иммуноглобулинов класса G к антигенам токсокар
в сыворотке (плазме) крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Утверждена 06.12.2013

Приказом Росздравнадзора № 7029-Пр/13



1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Токсокара-IgG-ИФА-БЕСТ (далее по тексту – набор) предназначен для выявления иммуноглобулинов класса G к антигенам токсокар в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Выявление иммуноглобулинов класса G к антигенам токсокар может быть использовано для диагностики токсокароза.

1.3. Набор рассчитан на проведение 96 определений, включая контрольные образцы, или 12 независимых постановок по 8 анализов каждая, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения иммуноглобулинов класса G к антигенам токсокар представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ, в ходе которого при взаимодействии исследуемых образцов сывороток (плазмы) крови в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами токсокар происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген–антитело» на поверхности лунок. После добавления в лунки планшета конъюгата моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс.

Комплекс «антиген–антитело–конъюгат» выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgG к антигенам токсокар в анализируемом образце сыворотки (плазмы) крови.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилучных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антигенами токсокар, готовый для использования – 1 шт.;
- положительный контрольный образец (K^+) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, содержащий иммуноглобулины класса G к антигенам токсокар, готовый для использования – 1 флакон (1,5 мл);
- отрицательный контрольный образец (K^-) на основе инаktivированной сыворотки крови человека, не содержащий иммуноглобулины класса G к антигенам токсокар, готовый для использования – 1 флакон (2,5 мл);
- конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);

- раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) – 1 флакон (10 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (12 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночкой для реагента – 2 шт.;
- наконечниками для пипетки на 5–200 мкл – 16 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Возможен перекрест иммунологических реакций при заболеваниях описторхозом, трихинеллезом и эхинококкозом, что может быть связано как с совместной инвазией, так и со взаимодействием антител с гетерологичным антигеном за счет иммунологических перекрестов между антигенами.

3.2. Специфическая активность.

Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G к антигенам токсокар – соответствие результатов качественного выявления

набором иммуноглобулинов класса G к антигенам токсокар требованиям стандартной панели предприятия СПП (рег. № 05-2-266), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с положительными сыворотками больше либо равны величине диагностического значения оптической плотности.

Специфичность выявления иммуноглобулинов класса G к антигенам токсокар – соответствие результатов качественного выявления набором иммуноглобулинов класса G к антигенам токсокар требованиям стандартной панели предприятия СПП (рег. № 05-2-266), аттестованной ОБТК АО «Вектор-Бест» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок с отрицательными сыворотками меньше величины диагностического значения оптической плотности.

3.3. Титр стандартного образца предприятия СОП⁺ (рег. № 05-2-174) должен быть не менее 1:800.

3.4. Диагностическая чувствительность: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 61 положительных образцах, взятых у больных с подтвержденным токсокарозом, показали 93% чувствительность (интервал 86–98%, с доверительной вероятностью 90%).

3.5. Диагностическая специфичность: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 63 отрицательных образцах, взятых у доноров, отобранных случайным образом, и больных с иной нозологией (атопический дерматит, бронхиальная астма, описторхоз, эозинофилия неясной этиологии, аскаридоз) показали 100% специфичность (интервал 95–100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и в методических указаний

МУ-287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционного, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 5 до 300 мкл;
- перчатки резиновые хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- флаконы вместимостью 10–15 мл;

- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови допускается хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 сут при отсутствии микробной контаминации или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 6 мес.

Следует избегать многократного замораживания / оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.3. Образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000–10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25°C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты набора и образцы сывороток (плазмы) крови при температуре от 18 до 25°C в течение времени не менее 60 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимые для проведения анализа количество стрипов. Использовать в течение 1 ч после установки. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°C до полного растворения осадка.

В таблице 1 приведен расход реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток.

7.4. Подготовка положительного (K^+) и отрицательного (K^-) контрольных образцов

Контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Положительный и отрицательный контрольные образцы после первого вскрытия фла-

конов можно хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности.

7.5. Предварительное разведение исследуемых образцов

В лунки планшета для предварительного разведения образцов внести по 90 мкл раствора для предварительного разведения сывороток (РПРС) и добавить по 10 мкл цельного образца сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешать. При разведении сыворотки красный цвет должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат. При разведении плазмы цвет раствора в лунке меняется незначительно.

Предварительно разведенные исследуемые образцы можно хранить при температуре от 18 до 25°C не более 3 ч.

7.6. Подготовка конъюгата

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА раствор конъюгата утилизировать **(не сливать во флакон с исходным конъюгатом)**.

Конъюгат после первого вскрытия флаконов хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

Таблица 1

Расход компонентов набора реагентов

Кол-во исполь- зуемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промывочный раствор	
			ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистил. вода, мл
1	1,0	1,0	2,0	до 50
2	2,0	2,0	4,0	до 100
3	3,0	3,0	6,0	до 150
4	4,0	4,0	8,0	до 200
5	5,0	5,0	10,0	до 250
6	6,0	6,0	12,0	до 300
7	7,0	7,0	14,0	до 350
8	8,0	8,0	16,0	до 400
9	9,0	9,0	18,0	до 450
10	10,0	10,0	20,0	до 500
11	11,0	11,0	22,0	до 550
12	12,0	12,0	24,0	до 600

В таблице 1 приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина

Раствор ТМБ готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента и поместить в защищенное от света место.

Оставшийся после проведения ИФА раствор тетраметилбензидаина утилизировать **(не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ)**.

Раствор ТМБ после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

В таблице 1 приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидаина.

Внимание! Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

7.9. Внесение образцов.

В лунку А-1 внести 100 мкл положительно-го контрольного образца (K^+). В лунки В-1 и С-1 внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца (K^-).

В остальные лунки внести по 90 мкл раствора для разведения сывороток (PPC) и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови (см п. 7.5), перемешать пипетированием. Для повышения достоверности результатов, исследуемые образцы рекомендуется анализировать в дублях, используя для каждого образца по две лунки.

Раствор для разведения сывороток перед употреблением встряхнуть!

7.10. Определение титра исследуемых образцов.

Для определения титра в выявленных положительных образцах в лунки горизонтального ряда А внести по 180 мкл PPC и по 20 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сывороток (плазмы) крови (см п. 7.5), перемешать пипетированием. В лунки рядов В-Н внести по 100 мкл PPC. Каждый образец титровать, перенося по 100 мкл раствора из лунок предыдущего ряда в лунки последующего от А до Н, тщательно перемешивая пипетированием. После раститровки из каждой лунки последнего ряда Н удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором по 100 мкл раствора, оставляя в лунках по 100 мкл. Таким образом, в вертикальных рядах получают последовательные 2-кратные разведения исследуемых образцов в интервале от 1:100 до 1:12800.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10 мин.

7.11. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.12. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата.

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.14. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.15. По окончании инкубации промыть планшет как описано в п. 7.12.

7.16. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

Планшет инкубировать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25°C.

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.17. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение оптической плотности при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху).

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Рассчитать средние арифметические значения оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом, для каждой пары лунок, содержащих образцы исследуемых сывороток (плазмы) и последовательные разведения исследуемых сывороток (плазмы) крови.

9.2. На основании полученных данных вычислить диагностическое значение оптической плотности (ОП_д) по формуле:

$$\text{ОП}_\text{д} = \text{ОП}_\text{ср. (К}^-\text{)} + 0,2,$$

где ОП_{ср. (К⁻)} – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом, ед. опт. плотн.

9.3. Оценка результатов:

– среднее значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом должно быть не более 0,25 ед. опт. плотн.;

– значение оптической плотности в лунке с положительным контрольным образцом должно быть не менее 0,80 ед. опт. плотн.

9.4. Только при соблюдении положений п. 9.3 можно учитывать результаты, полученные для анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

9.5. Результат анализа считают **положительным**, если $\text{ОП}_\text{обр.} \geq \text{ОП}_\text{д}$.

Результаты анализа считают **отрицательным**, если $\text{ОП}_\text{обр.} < \text{ОП}_\text{д}$,

где: ОП_{обр.} – среднее значение оптической плотности анализируемого образца в лунке, ед. опт. плотн.

9.6. Титр анализируемого образца сыворотки (плазмы) крови – наибольшее разведение анализируемого образца, при котором его оптическая плотность больше либо равна величине диагностического значения оптической плотности ($\text{ОП}_\text{обр.} \geq \text{ОП}_\text{д}$).

Диагноз токсокароз может быть поставлен у больных с титром антител к антигенам токсокар 1:800 и выше и с эозинофилией более 10%, и при наличии характерных клинических признаков.

При титрах антител 1:100–1:400 и уровне эозинофилии до 10% можно предположить глазной токсокароз или токсокароносительство, которое не обязательно приводит к развитию заболевания. Исследование сывороток людей с подозрением на токсокароносительство следует повторить через 3 мес.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8°C. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;

- положительный и отрицательный контрольные образцы, конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для предварительного разведения сывороток, раствор для разведения сывороток и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток.

10.5. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.6. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, раствор для предварительного разведения сывороток), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

**По вопросам, касающимся качества набора
«Токсокара-IgG-ИФА-БЕСТ»,
следует обращаться в АО «Вектор-БЕСТ»**

по адресу:

630559, Новосибирская область,

Новосибирский район,

п. Кольцово, а/я 121,

тел. (383) 363-13-46,

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Все реагенты наборов, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

Антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют.

Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности.

Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации IgG к антигенам токсокар в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

1. Гарантийные обязательства

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

2. Обеспечение безопасности персонала

Обращение с материалами, контактирующими с исследуемыми образцами

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать в соответствии п. 4.7. настоящей инструкции и согласно МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998).

Порядок утилизации или уничтожения компонентов набора

При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифи-

цируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

3. Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

- не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

- ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором ТМБ;

- избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

- рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

- никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

– перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо протереть конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона;

– если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

– Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.

– Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

– Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.

– Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

– Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

4. Оценка анализа по коэффициенту позитивности

Результаты анализа можно оценить по коэффициенту позитивности (КП), рассчитывая отношение ОП в лунке с исследуемым образцом относительно ОП_д (п. 9.2).

Для расчета коэффициента позитивности образцов, имеющих $ОП_{450} \leq 3,5$ о.е., использовать формулу:

$$КП_{обр.} = \frac{ОП_{450 \text{ обр.}}}{ОП_{д}},$$

где ОП_{450 обр.} – ОП образца, полученная в двухволновом режиме 450/620–655 нм (или только с фильтром 450 нм).

Для расчета коэффициента позитивности образцов, имеющих $ОП_{450} > 3,5$ о.е., использовать формулу:

$$КП_{обр.} = 3,2 \times \frac{ОП_{405 \text{ обр.}}}{ОП_{д}},$$

где ОП_{405 обр.} – ОП образца, полученная в двухволновом режиме 405/620–655 нм (или только с фильтром 405 нм).

Расчет КП целесообразно проводить для оценки концентрации специфических антител в исследуемых образцах и при наблюдении за изменением концентрации IgG к антигенам токсокар в динамике в парных образцах сывороток.

Ориентировочное соответствие коэффициента позитивности и титра приведено в таблице 2.

Результат анализа **отрицательный**, если $ОП_{обр.} < ОП_{Д}$ ($КП_{обр.} < 1$).

Результат анализа **слабоположительный**, если титр образца $1:100 \div 1:400$ ($1 \leq КП_{обр.} < 4,4$).

Результат анализа **положительный**, если титр образца $1:800$ и выше ($КП_{обр.} \geq 4,4$).

5. Диагностическая значимость полученных результатов

Выявление иммуноглобулинов класса G к антигенам токсокар может быть использовано для:

- диагностики токсокароза у лиц с характерным комплексом симптомов (лимфаденопатия, гепатомегалия, бронхит и бронхиальная астма неясного генеза, уртикарная сыпь) на фоне эозинофилии крови и лейкомоидной реакции эозинофильного типа, характерным эпиданамнезом (геофагия; виды деятельности, предполагающие контакт с землей);

- дифференциальной диагностики токсокароза от других гельминтозов и заболеваний, сопровождающихся выраженной эозинофилией;

Таблица 2

**Ориентировочное соответствие
коэффициента позитивности (КП)
и титра исследуемой сыворотки**

Значение КП	Титр сыворотки	Интерпретация результата
1–1,4	1:100	слабоположительный
1,4–2,5	1:200	слабоположительный
2,5–4,4	1:400	слабоположительный
4,4–6,5	1:800	положительный
6,5–9,0	1:1600	положительный
9,0–11,0	1:3200	положительный
11,0–11,8	1:6400	положительный
11,8–12,5	1:12800	положительный

– оценки эффективности лечения токсокароза;

– эпидемиологических исследований.

Интерпретацию результатов анализа проводит лечащий врач с учетом клинических признаков, эпиданамнеза и данных о содержании эозинофилов в крови обследуемых лиц.

**6. Краткая схема проведения ИФА
для набора реагентов
«Токсокара-IgG-ИФА-БЕСТ»**

*Использовать только после внимательного
ознакомления с инструкцией!*

- Внести:** по 100 мкл K^+ и K^- ;
по 90 мкл РРС и по 10 мкл
предварительно разведенных
анализируемых образцов.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором,
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 30 мин, 37°C.
- Промыть:** промывочным раствором,
400 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора тетраме-
тилбензидина.
- Инкубировать:** 25 мин, 18–25°C, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная
длина волны 620–655 нм.

7. Графические символы

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до ...		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 363-35-56.

14.05.18.

АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»

Международный сертификат ISO 13485

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru

www.vector-best.ru

HAV IgM

**“Capture” Enzyme Immuno Assay (ELISA)
for the determination of IgM class
antibodies to Hepatitis A Virus
in human plasma and sera**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) – Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

HAV IgM

REF AVM.CE
96 tests

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the determination of IgM class antibodies to Hepatitis A Virus in human plasma and sera with the "capture" system. The kit may be used for the identification of the viral agent causing hepatitis in the patient and the follow up of the acute phase of the infection. For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

The Center for Disease Control or CDC, Atlanta, USA, defines Hepatitis A Virus as follows:

Hepatitis A continues to be one of the most frequently reported vaccine-preventable diseases in the world, despite the licensure of hepatitis A vaccine in 1995. Widespread vaccination of appropriate susceptible populations would substantially lower disease incidence and potentially eliminate indigenous transmission of hepatitis A virus (HAV) infection.

HAV, a 27-nm RNA agent classified as a picornavirus, can produce either asymptomatic or symptomatic infection in humans after an average incubation period of 28 days (range, 15-50 days). The illness caused by HAV infection typically has an abrupt onset of symptoms that can include fever, malaise, anorexia, nausea, abdominal discomfort, dark urine, and jaundice. The likelihood of having symptoms with HAV infection is related to the person's age. In children less than 6 years of age, most (70%) infections are asymptomatic; if illness does occur, it is not usually accompanied by jaundice. Among older children and adults, infection is usually symptomatic, with jaundice occurring in greater than 70% of patients. Signs and symptoms usually last less than 2 months, although 10%-15% of symptomatic persons have prolonged or relapsing disease lasting up to 6 months.

In infected persons, HAV replicates in the liver, is excreted in bile, and is shed in the stool. Peak infectivity of infected persons occurs during the 2-week period before onset of jaundice or elevation of liver enzymes, when the concentration of virus in stool is highest. The concentration of virus in stool declines after jaundice appears. Children and infants can shed HAV for longer periods than adults, up to several months after the onset of clinical illness. Chronic shedding of HAV in feces does not occur; however, shedding can occur in persons who have relapsing illness. Viremia occurs soon after infection and persists through the period of liver enzyme elevation.

Hepatitis A cannot be differentiated from other types of viral hepatitis on the basis of clinical or epidemiologic features alone. Serologic testing to detect immunoglobulin M (IgM) antibody to the capsid proteins of HAV (IgM anti-HAV) is required to confirm a diagnosis of acute HAV infection. In most persons, IgM anti-HAV becomes detectable 5-10 days before the onset of symptoms and can persist for up to 6 months after infection. Immunoglobulin G (IgG) anti-HAV, which appears early in the course of infection, remains detectable for the person's lifetime and confers lifelong protection against the disease. Commercial diagnostic tests are available for the detection of IgM and total (IgM and IgG) anti-HAV in serum.

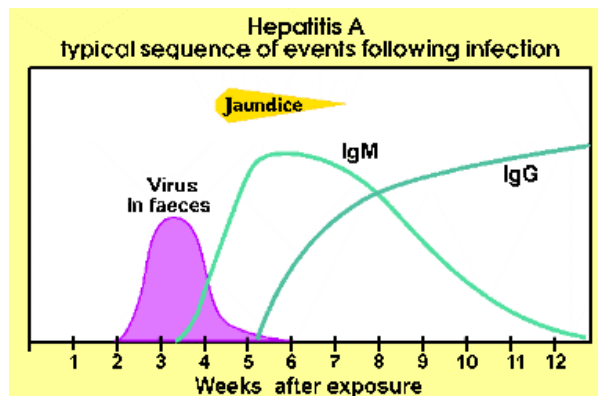
HAV RNA can be detected in the blood and stool of most persons during the acute phase of infection by using nucleic acid amplification methods, and nucleic acid sequencing has been used to determine the relatedness of HAV isolates.

HAV infection is acquired primarily by the fecal-oral route by either person-to-person contact or ingestion of contaminated food or water. On rare occasions, HAV infection has been transmitted by transfusion of blood or blood products collected from donors during the viremic phase of their infection. In experimentally infected nonhuman primates, HAV has been detected in saliva during the incubation period; however, transmission by saliva has not been demonstrated.

Depending on conditions, HAV can be stable in the environment for months. Heating foods at temperatures greater than 185 F (85

C) for 1 minute or disinfecting surfaces with a 1:100 dilution of sodium hypochlorite (i.e., household bleach) in tap water is necessary to inactivate HAV.

Because most children have asymptomatic or unrecognized infections, they play an important role in HAV transmission and serve as a source of infection for others. In one study of adults without an identified source of infection, 52% of their households included a child less than 6 years old, and the presence of a young child was associated with HAV transmission within the household. In studies where serologic testing of the household contacts of adults without an identified source of infection was performed, 25%-40% of the contacts less than 6 years old had serologic evidence of acute HAV infection (IgM anti-HAV).



C. PRINCIPLE OF THE TEST

The assay is based on the principle of "IgM capture" where IgM class antibodies in the sample are first captured by the solid phase coated with anti hIgM antibody.

After washing out all the other components of the sample and in particular IgG antibodies, the specific IgM captured on the solid phase are detected by the addition of a purified preparation of inactivated HAV, labelled with an antibody conjugated with peroxidase (HRP).

After incubation, microwells are washed to remove unbound conjugate and then the chromogen/substrate is added.

In the presence of peroxidase the colorless substrate is hydrolysed to a colored end-product, whose optical density may be detected and is proportional to the amount of antibodies to HAV present in the sample.

D. COMPONENTS

The kit contains reagents for 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips of 8 breakable wells coated with anti human IgM antibody, affinity purified, and sealed into a bag with desiccant. Bring the microplate to room temperature before opening the bag. Unused strips have to be returned into the bag and the bag has to be sealed and stored back to 2..8°C, in presence of the desiccant.

2. Negative Control: CONTROL -

1x4.0 ml/vial. Ready to use control. It contains goat serum proteins, 10 mM tris buffer pH 6.0+/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% sodium azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The negative control is colourless.

3. Positive Control: CONTROL +

1x4.0 ml/vial. Ready to use control. It contains anti HAV IgM, goat serum proteins, 10 mM tris buffer pH 6.0+/-0.1, 0.1% Tween

20, 0.09% sodium azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The positive control is green colour coded.

4. Calibrator: CAL ...

N° 1 lyophilized vial. To be dissolved with EIA grade water as reported in the label. It contains anti HAV IgM, 2% BSA, 10 mM tris buffer pH 6.0+/-0.1, 0.09% sodium azide and 0.045% ProClin 300 GC as preservatives.

Note: The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label .

5. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle. 20x concentrated solution.

Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

6. Enzyme conjugate 20X: CONJ

1x0.8 ml/vial. 20X concentrated solution. It contains Horseradish peroxidase conjugated antibody specific to HAV in presence of 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

7. HAV Antigen: Ag HAV

1x16 ml/vial. Ready-to-use solution. It contains inactivated and stabilised HAV in presence of 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

The reagent is red colour coded.

8. Specimen Diluent: DILSPE

2x60.0 ml/vial. Proteic buffered solution for the dilution of samples. It contains goat serum proteins, 10 mM tris buffer pH 6.0+/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% sodium azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

The reagent is blue colour coded.

9. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

1x16ml/vial. It contains a 50 mM citrate-phosphate buffered solution at pH 3.5-3.8, 0.03% tetra-methyl-benzidine or TMB and 0.02% hydrogen peroxide of H₂O₂.

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

10. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vial.

It contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

11. Plate sealing foils n° 2

12. Package insert n° 1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes of 10ul, 100ul and 1000ul and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (double distilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator (dry or wet) set at +37°C (+/-0.1°C tolerance).
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.

4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen/Substrate (TMB & H₂O₂) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.

5. Upon receipt, store the kit at 2-8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.

6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.

7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures.

8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.

9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.

10. Do not use the kit after the expiration date stated on external (primary container) and internal (vials) labels. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

11. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the washing solution or in transferring components into other containers of automated workstations, in order to avoid contamination.

12. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..

13. Accidental spills have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.

14. The Stop Solution is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water

15. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND RECOMMANDATIONS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.

2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and reading is strongly recommended.

3. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.

5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8µ filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 3 months.

1. Antibody coated microwells:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant has not turned dark green, indicating a defect in conservation.

In this case, call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back into the aluminium pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°-8°C. When opened the first time, unused strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

2. Negative Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

3. Positive Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use. Handle this component as potentially infectious, even if HAV, eventually present in the control, has been chemically inactivated.

4. Calibrator:

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilised powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex. The solution is not stable. Store the Calibrator frozen in aliquots at -20°C.

Note: When dissolved the Calibrator is not stable. Store in aliquots at -20°C.

5. Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use.

Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at 2-8° C. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2...8° C.

6. Enzyme conjugate:

20X preparation. Mix well on vortex.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, dust or microbes when the reagent is aspirated to be used.

7. HAV Antigen:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Handle this component as potentially infectious, even if HAV has been chemically inactivated.

6+7. HAV Antigen/Antibody complex:

About 5-10 min before its use, dilute the 20X concentrated Enzyme Conjugate in the proper volume of HAV Antigen, necessary for the assay. Then mix on vortex carefully.

Example: To run 2 strips, dilute 100 µl Enzyme Conjugate 20X into 2 ml of HAV Antigen.

Note: This immunocomplex is not stable; discard the exceeding volume.

8. Sample Diluent:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

9. Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong light, oxidizing agents and metallic surfaces. If this component has to be transferred use only plastic, and if possible, sterile disposable container.

10. Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume (tolerance +/-5%) required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of ±2%.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/-0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested). 5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350µl/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing. An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of ±5%.
5. The ELISA reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to 4; (c) linearity to 4; (d) repeatability ≥ 1%. Blanking is carried out

on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.

- When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section O "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
- Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

- Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use the device if expired.
- Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates. Check that the Chromogen/Substrate is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
- Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
- Dissolve the Calibrator as described above and gently mix.
- Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
- Set the ELISA incubator at +37°C +/-0.1°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
- Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
- If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
- Check that the micropipettes are set to the required volume.
- Check that all the other equipment is available and ready to use.
- In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

- Dilute samples 1:101 by dispensing first 10 µl sample and then 1 ml Sample Diluent into a dilution tube; mix gently on vortex.
- Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the 1st well empty for the operation of blanking.
- Dispense 100 µl Negative Control in triplicate, 100 µl Positive Control in single and 100 µl Calibrator in duplicate in proper wells. Do not dilute controls and the calibrator as they are ready to use!

- Dispense 100 µl diluted samples in the proper sample wells and then check that all the samples wells are blue coloured and that controls and calibrator have been dispensed.
- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- About 5-10 minutes before use, prepare the HAV Antigen/Antibody immunocomplex as described previously.
- Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section I.3).
- Pipette 100 µl HAV Antigen/Antibody complex into each well, except the 1st blanking well, and cover with the sealer. Check that all wells are red coloured, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
- Wash microwells as in step 7.
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells to stop the enzymatic reaction using the same pipetting sequence as in step 10. Addition of acid will turn the positive control and positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

Important notes:

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

N. ASSAY SCHEME

Controls&Calibrator (*) samples diluted 1:101	100 ul
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Washing	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
HAV & Tracer	100 ul
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Washing	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H2O2 mix	100 ul
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm/620-630nm

(*) Important Notes:

- The Calibrator (CAL) does not affect the Cut Off calculation, therefore it does not affect the test's results calculation.
- The Calibrator (CAL) used only if a laboratory internal quality control is required by the Management.

An example of dispensation scheme is reported in the table below:

Microplate												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL(*)	S6										
F	CAL(*)	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control
CAL(*) = Calibrator - Not mandatory PC = Positive Control S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A check is performed on the controls any time the kit is used in order to verify whether the expected OD450nm/620-630nm or S/Co values have been matched in the analysis.

Ensure that the following parameters are met:

Parameter	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
Negative Control mean value (NC)	< 0.150 OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
Positive Control	> 0.500 OD450nm

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

If they do not, do not proceed any further and perform the following checks:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not become contaminated during the assay
Negative Control (NC) > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of negative control); 4. that no contamination of the negative control or of the wells where the control was dispensed has occurred due to positive samples, to spills or to the enzyme conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

Positive Control < 0.500 OD450nm	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during the distribution of the control (dispensation of negative control instead of positive control). 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.
---	--

If any of the above problems have occurred, report the problem to the supervisor for further actions.

If Calibrator has used, verify the following data:

Parameter	Requirements
Calibrator	S/Co > 1

If the results of the test doesn't match the requirements stated above, operate as follows:

Problem	Check
Calibrator S/Co < 1	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution (e.g.: dispensation of negative control instead) 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.

Anyway, if all other parameters (Blank, Negative Control, Positive Control), match the established requirements, the test may be considered valid.

Important note:

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 13.

P. CALCULATION OF THE CUT-OFF

The test results are calculated by means of the mean OD450nm/620-630nm value of the Negative Control (NC) and a mathematical calculation, in order to define the following cut-off formulation:

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

The value found for the test is used for the interpretation of results as described in the next paragraph.

Important note: When the calculation of results is performed by the operating system of an ELISA automated work station, ensure that the proper formulation is used to calculate the cut-off value and generate the correct interpretation of results.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

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

S/Co	Interpretation
< 0.8	Negative
0.8 – 1.2	Equivocal
> 1.2	Positive

A negative result indicates that the patient is not undergoing an acute infection by HAV.

Any patient showing an equivocal result, should be re-tested by examining a second sample after 1-2 weeks from first testing. A positive result is indicative of an HAV infection event and therefore the patient should be treated accordingly.

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 13):

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

Negative Control: 0.050 – 0.060 – 0.070 OD450nm
Mean Value: 0.060 OD450nm
Lower than 0.150 – Accepted
Positive Control: 2.189 OD450nm
Higher than 0.500 – Accepted

Cut-Off = 0.060+0.250 = 0.310

Calibrator: 0.550 - 0.530 OD450nm
Mean value: 0.540 OD450nm S/Co = 1.7
S/Co higher than 1.0 – Accepted

Sample 1: 0.070 OD450nm
Sample 2: 1.690 OD450nm
Sample 1 S/Co < 0.8 = negative
Sample 2 S/Co > 1.2 = positive

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. Any positive result should be confirmed by an alternative method (confirmation test) before a diagnosis of viral hepatitis is confirmed.
3. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
4. Diagnosis of viral hepatitis infection has to be taken by and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Limit of detection

In absence of a defined international standard for HAV IgM, the limit of detection of the assay has been calculated by means of the following preparations:

1. Accurun # 121 supplied by Boston Biomedica Inc. – USA
2. Accurun # 51 supplied by Boston Biomedica Inc., USA

These preparation were prepared according to the manufacturer's instructions, diluted in Sample Diluent (1:100) and then further diluted in Sample Diluent to generate a limiting curve (accurun # 121).

Results of Quality Control are given in the following table:

Preparation	Dilutions	S/Co
Accurun # 121	1:100	5.4
	1:200	4.1
	1:400	2.8
	1:800	1.9
	1:1600	1.0
Accurun # 51	1:100	4.2

2. Diagnostic Sensitivity:

The diagnostic sensitivity has been tested on panels of samples classified positive by a US FDA approved kit. Positive samples were collected from patients carrying HAV acute infection, confirmed by clinical symptoms and analysis.

An overall value of 100% has been found in the study conducted on a total number of more than 100 samples.

A seroconversion panel has also been studied.

Results obtained by examining a preparation supplied by Boston Biomedica Inc., USA, are reported below.

Seroconversion Panel : PHT 902

Sample	OD450nm	S/Co	DiaSorin Refer.	
			S/Co	Score
CTRL (-)	0,048	0,2		
CTRL (+)	1,736	5,8		
PHT902				
1	0,037	0,1	0,3	neg
2	0,042	0,1	0,3	neg
3	1,956	6,6	6,8	pos
4	1,988	6,7	6,7	pos
5	0,669	2,2	1,5	pos

3. Diagnostic Specificity:

The diagnostic specificity has been determined on panels of specimens, negative with the reference kit, derived from normal individuals and blood donors of European origin.

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

Frozen specimens have also been tested to check whether this interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

Samples derived from patients with different viral (HCV, HDV, HBV, HEV) and non viral pathologies of the liver that may interfere with the test were examined.

No cross reaction were observed.

The Performance Evaluation study conducted in a qualified external reference centre on more than 500 samples has provided a value > 98%.

3. Precision:

It has been calculated on two samples, one negative and one low positive, examined in 16 replicates in three separate runs. Results are reported as follows:

Test # 1

Sample	Negative	Low Pos.
OD450nm	0.058	0.719
Std. Deviation	0.008	0.052
CV %	14.3	7.2

Test # 2

Sample	Negative	Low Pos.
OD450nm	0.048	0.709
Std. Deviation	0.007	0.063
CV %	13.9	8.9

Test # 3

Sample	Negative	Low Pos.
OD450nm	0.050	0.713
Std. Deviation	0.007	0.055
CV %	13.4	7.7

Important note:

The performance data have been obtained proceeding as the reading step described in the section M, point 13.

S. LIMITATIONS

False positivity has been assessed as less than 2% of the normal population, mostly due to high titers of RF.

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

Bacterial contamination or heat inactivation of the specimen may affect the absorbance values of the samples with consequent alteration of the level of the analyte.

This test is suitable only for testing single samples and not pooled ones.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. The patient's clinical history, symptomatology, as well as other diagnostic data should be considered.

REFERENCES

1. Dienstag J.L.. "Hepatitis A Virus : identification, characterization and epidemiologic investigations". Progress in liver disease VI, Popper E., Schaffner F. (eds), pp 343-370, New York, Gruner and Stratton, 1979.
2. Duermeier W., Van der Veen J., Koster B. "ELISA in Hepatitis A". Lancet. I.: 823-824, 1978
3. Parry J.V., (1981) "Hepatitis A infection: guidelines for the development of satisfactory assays for laboratory diagnosis". The Institute of Medical Laboratory Sciences, 38, 303-311.
4. Lindberg J., Frosner G., Hansson B.G. et al. "Serologic markers of hepatitis A and B in chronic active hepatitis". Scandinavian Journal of Gastroenterology, 13:525-527, 1978.
5. Barbara J.A., Howell D.R., Briggs M., Parry J.V.. "Post transfusion hepatitis A". Lancet (1982), 1-738.
6. Zachoval R., Dienstag J.L., Purcell R.H. "Tests for hepatitis A virus antigen and antibody" in "Hepatitis A". Gerety R.J. (Ed), pp 33-46, Orlando, Academic Press, Inc. 1984

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System in compliance with ISO 13485 rule. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:

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



HCV IgM

**Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for
the quantitative/qualitative determination
of IgM antibodies to
Hepatitis C Virus
in human serum and plasma**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

HCV IgM

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the quantitative/qualitative determination of IgM antibodies to Hepatitis C Virus in human plasma and sera. The kit is mainly intended for the follow-up of HCV chronic patients submitted to anti-viral pharmaceutical treatment. For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

Antiviral drugs, such as Interferon taken alone or in combination with Ribavirin, can be used for the treatment of persons with chronic viral hepatitis C.

Treatment with interferon alone is effective in about 10% to 20% of patients. Interferon combined with Ribavirin is effective in about 30% to 50% of patients. Ribavirin does not appear to be effective when used alone.

Active production of HCV antigens in the liver of chronic patients generates spikes of IgM antibodies production and release of liver specific enzymes, similar to what happen in HBV chronic patients. The presence of anti viral IgM is usually correlated to a phase of sufferance and cellular damage of the liver.

During the pharmaceutical treatment HCV IgM may represent a marker for the follow-up of the efficiency of the drug itself, monitoring the balance between its effectiveness and the side effects, that often may be heavy for the patient.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with HCV immunodominant synthetic antigens (core peptide, recombinant NS3, NS4 and NS5 peptides).

In the 1st incubation, the solid phase is treated with diluted samples and anti HCV IgM are captured, if present, by the antigens. After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti-HCV IgM are detected by the addition of anti hlgM antibody, labeled with peroxidase (HRP). The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti-HCV IgM antibodies present in the sample.

The presence of IgM in the sample may therefore be quantitated by means of a calibration curve able to determine the content of the antibody in arbU/ml.

Neutralization of IgG anti-HCV, carried out directly in the well, is performed in the assay in order to block interferences due to this class of antibodies in the determination of IgM.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 microwells coated with HCV-specific synthetic antigens (core, NS4 and NS5 peptides and recombinant NS3). Plates are sealed into a bag with desiccant.

2. Calibration Curve: CAL N°...

6x2.0 ml/vial. Ready to use and color coded standard curve calibrated on an Internal Gold Standard (in absence of a defined international one) or IGS, ranging:

CAL 1 = 0 arbU/ml	CAL 2 = 10 arbU/ml
CAL 3 = 25 arbU/ml	CAL 4 = 50 arbU/ml
CAL 5 = 100 arbU/ml	CAL 6 = 250 arbU/ml.

It contains chemical inactivated HCV IgM positive human plasma, 100 mM Tris buffer pH 7.4+/-0.1, 0.2% Tween 20, 0.09% sodium azide and 0.045% de ProClin 300 as preservatives.

The Calibration Curve is coded with blue alimentary dye.

Important Note: Even if plasma has been chemically inactivated, handle this component as potentially infectious.

3. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle 20x concentrated solution. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

4. Enzyme conjugate : CONJ

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

5. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

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

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

6. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vialIt contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

7. Specimen Diluent: DILSPE

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.2% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

8. Neutralizing Reagent: SOLN NEUT

1x8ml/vial. It contains goat anti hlgG, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

9. Plate sealing foils n°2

10. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

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

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venipuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or

microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection.

Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for several months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.

5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of storing.

In this case call Dia.Pro's customer service.

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

Calibration Curve

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

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable container

Sample Diluent

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

Neutraling Reagent

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

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. **Micropipettes** have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The **ELISA incubator** has to be set at +37°C (tolerance of +/-0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested). 5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing. An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of $\pm 5\%$.
5. The **ELISA microplate reader** has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0 ; (c) linearity to ≥ 2.0 ; repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.
6. When using an **ELISA automated workstation**, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and

validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.

7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen/Substrate is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
6. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
7. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
8. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
9. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
10. Check that the micropipettes are set to the required volume.
11. Check that all the other equipment is available and ready to use.
12. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

Two methods of analysis are possible, as described below:

M.1 QUANTITATIVE ASSAY

1. Place the required number of strips in the plastic holder and carefully identify the wells for calibrators and samples.
2. Dilute samples **1:101** dispensing 1 ml Sample Diluent into a disposable tube and then 10 ul sample; mix on vortex before use. Do not dilute the Calibrators as they are ready-to-use.
3. Leave the A1+B1 wells empty for blanking purposes.
4. Dispense 50 μ l Neutralizing Reagent in all the wells, except A1+B1 wells used for blanking operations and the wells used for the Calibration Curve.

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

- In the identified positions pipette 100 µl of the Calibrators in duplicate followed by 100 µl of diluted samples. Check that Calibrators and samples have been correctly added.
- Incubate the microplate **for 60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, only when the test is performed manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- When the first incubation is finished, wash the microwells as previously described (section I.3)
- In all the wells, except A1+B1, pipette 100 µl Enzyme Conjugate. Incubate the microplate **for 60 min at +37°C**.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

- When the second incubation is finished, wash the microwells as previously described (section I.3)
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate into all the wells, A1+B1 included.

Important note: Do not expose to strong direct light. as a high background might be generated.

- Incubate the microplate protected from light at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**. Wells dispensed with positive samples and with positive calibrators will turn from clear to blue.
- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 10 to block the enzymatic reaction. Addition of the stop solution will turn the positive calibrators and the positive samples from blue to yellow.
- Measure the color intensity of the solution in each well, as described in section I.5 using a 450nm filter (reading) and a 620-630nm filter (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1 or B1 or both.

M.2 QUALITATIVE ASSAY

- Place the required number of strips in the plastic holder and carefully identify the wells for calibrators and samples.
- Dilute samples **1:101** dispensing 1 ml Sample Diluent into a disposable tube and then 10 µl sample; mix on vortex before use. Do not dilute the Calibrators as they are ready-to-use.
- Leave the A1 well empty for blanking purposes.
- Dispense 50 µl Neutralizing Reagent in all the wells, except A1 well used for blanking operations and the wells used for the Calibrators.
- Then pipette 100 µl of Calibrator 0 arbU/ml in duplicate, 100 µl of Calibrator 10 arbU/ml in triplicate and finally 100 µl of diluted samples. Check that Calibrators and samples have been correctly added.
- Incubate the microplate **for 60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, only when the test is performed manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- When the first incubation is finished, wash the microwells as previously described (section I.3)
- In all the wells, except A1, pipette 100 µl Enzyme Conjugate. Incubate the microplate **for 60 min at +37°C**.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

- When the second incubation is finished, wash the microwells as previously described (section I.3)

- Pipette then 100 µl Chromogen/Substrate into all the wells, A1 included.

Important note: Do not expose to strong direct light. as a high background might be generated.

- Incubate the microplate protected from light at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**. Wells dispensed with positive samples and with positive calibrators will turn from clear to blue.
- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 10 to block the enzymatic reaction. Addition of the stop solution will turn the positive calibrators and the positive samples from blue to yellow.
- Measure the color intensity of the solution in each well, as described in section I.5 using a 450nm filter (reading) and a 620-630nm filter (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

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

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Neutralizing Reagent	50 µl
Calibrators (no SOLN NEUT !)	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H2O2	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm / 620-630nm

An example of dispensation scheme in quantitative assays is reported below:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S3									
B	BLK	CAL4	S4									
C	CAL1	CAL5	S5									
D	CAL1	CAL5	S6									
E	CAL2	CAL6	S7									
F	CAL2	CAL6	S8									
G	CAL3	S1	S9									
H	CAL3	S2	S10									

Legenda: BLK = Blank // CAL = Calibrators // S = Sample

An example of dispensation scheme in qualitative assays is reported below:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S3										
B	CAL1	S4										
C	CAL1	S5										
D	CAL2	S6										
E	CAL2	S7										
F	CAL2	S8										
G	S1	S9										
H	S2	S10										

Legenda: BLK = Blank // CAL = Calibrators // CS = Control Serum // S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as qualified. Control that the following data are matched:

Parameter	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm
Calibrator 0 arbU/ml	< 0.200 OD450nm after blanking
Calibrator 10 arbU/ml	OD450nm > OD450nm CAL 0 arbU/ml + 0.100
Calibrator 250 arbU/ml	3.500 > OD450nm > 2.000

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

If they do not, do not proceed any further and perform the following checks:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not become contaminated during the assay
Calibrator 0 arbU/ml > 0.200 OD450nm after blanking	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive calibrators instead of Cal 0 arbU/ml); 4. that no contamination of the Cal 0 arbU/ml, or of the wells where this was dispensed, has occurred due to positive samples, to spills or to the enzyme conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

Calibrator 10 arbU/ml < CAL 0 + 0.100	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution; 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
Calibrator 250 arbU/ml < 2.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during the distribution of the calibrator; 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
Calibrator 250 arbU/ml > 3.500 OD450nm after blanking	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure; 4. that no contamination of the Cal 250 arbU/ml, or of the wells where this was dispensed, has occurred due to positive samples, to spills or to the enzyme conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

If any of the above problems has occurred, report the problem to the supervisor for further actions.

P. RESULTS

If the test turns out to be valid, interpretation of results is carried out in the **quantitative assay** from the mean OD450nm value of the Calibration Curve elaborated with an appropriate curve fitting system (suggested : 4 parameters).

In the **qualitative assay** interpretation of results is done on the mean OD450nm value of the Calibrator 10 arbU/ml (or CAL 2) by means of the following formulation:

$$\text{Mean OD450nm CAL 2} = \text{cut-off (Co)}$$

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

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Q.1 QUANTITATIVE ASSAY

Concentrations in arbU/ml are obtained elaborating OD450nm of samples on the fitted calibration curve.

The concentration of IgM is from Literature correlated proportionally with the liver damage produced by antibodies to HCV upon virus replication in hepatocytes.

A decrease in IgM concentration upon pharmacological treatment is usually clinically acknowledged as a sign of recovery and therapeutic efficacy.

Q.2 QUALITATIVE ASSAY

Test results are interpreted as a ratio of the sample OD450nm value (S) and the cut-off value (Co), or S/Co, according to the following table:

S/Co	Interpretation
< 1.0	Negative
> 1.0	Positive

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

A positive result is indicative of an ongoing HCV active infection.

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
3. Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.
4. The results of this ELISA assay should be anyway implemented with other diagnostic and clinical tests.

An example of calculation is reported below.

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

CAL 1: 0.060 – 0.080 OD450nm
Mean Value: 0.070 OD450nm
Lower than 0.200 – Accepted

CAL 2: 0.200 – 0.220 – 0.021 OD450nm
Mean Value: 0.210 OD450nm
Higher than CAL1+0.100 = accepted
Cut-Off or Co = 0.210

Sample 1: 0.080 OD450nm
Sample 2: 1.800 OD450nm
Sample 1: S/Co < 1.0 = negative
Sample 2: S/Co > 1.0 = positive

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted on selected panels carried out in a clinical external center and internally.

1. Limit of detection

No international standard for HCV IgM Antibody detection has been defined so far by the European Community.

In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient with an history of chronic HCV infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The diagnostic performances were evaluated in a study conducted in an external clinical center, with excellent experience in the diagnosis of infectious diseases and HCV.

The Diagnostic Sensitivity was studied on about 200 samples, pre-tested positive with an analytical system developed in house by the clinical laboratory where the study was conducted. Positive samples were collected from patients with a clinical history of HCV infection (acute and chronic).

In addition some Seroconversion Panels, purchased from Boston Biomedica Inc., USA, were examined.

The diagnostic specificity was determined on panels of more than 300 negative samples from normal individuals and blood donors, classified negative for anti HCV antibodies with the reference kit in use in the laboratory, including potentially interfering specimens.

A panel of potentially interfering samples (RF+, hemolised, lipemic, etc.) was also examined. No interference was observed on the samples examined.

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

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

The Performance Evaluation provided the following values :

Sensitivity	> 98 %
Specificity	> 98 %

3. Reproducibility:

It has been calculated on two samples examined in replicates in different runs. Results are reported below summarized in a table:

Average values N = 48	Calibrator 2 10 arbU/ml	Calibrator5 100 arbU/ml
OD450nm	0.241	1.632
Std.Deviation	0.027	0.113
CV %	11.3	6.9

S. LIMITATIONS

False positivity has been assessed on less than 2% of the normal population, mostly due to high titers of RF.

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

BIBLIOGRAPHY

1. Krasavtsev EL, Zhavoronok SV, Mitsura VM, Demchilo AP. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2006 Mar-Apr;(2):57-61
2. Papatheodoridis GV, Delladetsima JK, Katsoulidou A, Sypsa V, Albrecht M, Michel G, Hatzakis A, Tassopoulos NC. J Hepatol. 1997 Jul;27(1):36-41.
3. Martinelli AL, Brown D, Braun HB, Michel G, Dusheiko GM. J Hepatol. 1996 Jan;24(1):21-6.
4. Pawlotsky JM, Darthuy F, Remire J, Pellet C, Udin L, Stuyver L, Roudot-Thoraval F, Duvoux C, Douvin C, Mallat A, et al. J Med Virol. 1995 Nov;47(3):285-91.
5. Stransky J, Honzakova E, Vandasova J, Horejsova M, Kynci J, Nemecek V, Horak J. Acta Virol. 1996 Apr;40(2):61-5.
6. Nikolaeva LI, Blokhina NP, Tsurikova NN, Voronkova NV, Miminoshvili MI, Braginsky DM, Yastrebova ON, Boynitskaya OB, Isaeva OV, Michailov MI, Archakov AI. Gut. 2000 Nov;47(5):698-702.
7. Bizollon T, Ahmed SN, Guichard S, Chevallier P, Adham M, Ducerf C, Baulieux J, Trepo C. J Med Virol. 1998 Nov;56(3):224-9.
8. Tran A, Yang G, Dreyfus G, Rouquie P, Durant J, Rampal A, Rampal P, Benzaken S. Am J Gastroenterol. 1997 Oct;92(10):1835-8.

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

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



0318

HCV Ab

**Version 4.0 Enzyme Immunoassay
for the determination of
anti Hepatitis C Virus antibody
in human serum and plasma**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF CVAB.CE
96,192,480,960 Tests

HCV Ab

A. INTENDED USE

Version 4.0 Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the determination of antibodies to Hepatitis C Virus in human plasma and sera. The kit is intended for the screening of blood units and the follow-up of HCV-infected patients. For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) define Hepatitis C infection as follows:

"Hepatitis C is a viral infection of the liver which had been referred to as parenterally transmitted "non A, non B hepatitis" until identification of the causative agent in 1989. The discovery and characterization of the hepatitis C virus (HCV) led to the understanding of its primary role in post-transfusion hepatitis and its tendency to induce persistent infection.

HCV is a major cause of acute hepatitis and chronic liver disease, including cirrhosis and liver cancer. Globally, an estimated 170 million persons are chronically infected with HCV and 3 to 4 million persons are newly infected each year. HCV is spread primarily by direct contact with human blood. The major causes of HCV infection worldwide are use of unscreened blood transfusions, and re-use of needles and syringes that have not been adequately sterilized. No vaccine is currently available to prevent hepatitis C and treatment for chronic hepatitis C is too costly for most persons in developing countries to afford. Thus, from a global perspective, the greatest impact on hepatitis C disease burden will likely be achieved by focusing efforts on reducing the risk of HCV transmission from nosocomial exposures (e.g. blood transfusions, unsafe injection practices) and high-risk behaviours (e.g. injection drug use).

Hepatitis C virus (HCV) is one of the viruses (A, B, C, D, and E), which together account for the vast majority of cases of viral hepatitis. It is an enveloped RNA virus in the *flaviviridae* family which appears to have a narrow host range. Humans and chimpanzees are the only known species susceptible to infection, with both species developing similar disease.

An important feature of the virus is the relative mutability of its genome, which in turn is probably related to the high propensity (80%) of inducing chronic infection. HCV is clustered into several distinct genotypes which may be important in determining the severity of the disease and the response to treatment.

The incubation period of HCV infection before the onset of clinical symptoms ranges from 15 to 150 days. In acute infections, the most common symptoms are fatigue and jaundice; however, the majority of cases (between 60% and 70%), even those that develop chronic infection, are a symptomatic. About 80% of newly infected patients progress to develop chronic infection. Cirrhosis develops in about 10% to 20% of persons with chronic infection, and liver cancer develops in 1% to 5% of persons with chronic infection over a period of 20 to 30 years. Most patients suffering from liver cancer who do not have hepatitis B virus infection have evidence of HCV infection. The mechanisms by which HCV infection leads to liver cancer are still unclear. Hepatitis C also exacerbates the severity of underlying liver disease when it coexists with other hepatic conditions. In particular, liver disease progresses more rapidly among persons with

alcoholic liver disease and HCV infection. HCV is spread primarily by direct contact with human blood. Transmission through blood transfusions that are not screened for HCV infection, through the reuse of inadequately sterilized needles, syringes or other medical equipment, or through needle-sharing among drug-users, is well documented. Sexual and perinatal transmission may also occur, although less frequently. Other modes of transmission such as social, cultural, and behavioural practices using percutaneous procedures (e.g. ear and body piercing, circumcision, tattooing) can occur if inadequately sterilized equipment is used. HCV is not spread by sneezing, hugging, coughing, food or water, sharing eating utensils, or casual contact.

In both developed and developing countries, high risk groups include injecting drug users, recipients of unscreened blood, haemophiliacs, dialysis patients and persons with multiple sex partners who engage in unprotected sex. In developed countries, it is estimated that 90% of persons with chronic HCV infection are current and former injecting drug users and those with a history of transfusion of unscreened blood or blood products. In many developing countries, where unscreened blood and blood products are still being used, the major means of transmission are unsterilized injection equipment and unscreened blood transfusions. In addition, people who use traditional scarification and circumcision practices are at risk if they use or re-use unsterilized tools.

WHO estimates that about 170 million people, 3% of the world's population, are infected with HCV and are at risk of developing liver cirrhosis and/or liver cancer. The prevalence of HCV infection in some countries in Africa, the Eastern Mediterranean, South-East Asia and the Western Pacific (when prevalence data are available) is high compared to some countries in North America and Europe.

Diagnostic tests for HCV are used to prevent infection through screening of donor blood and plasma, to establish the clinical diagnosis and to make better decisions regarding medical management of a patient. Diagnostic tests commercially available today are based on Enzyme immunoassay (EIA) for the detection of HCV specific antibodies. EIAs can detect more than 95% of chronically infected patients but can detect only 50% to 70% of acute infections. A recombinant immunoblot assay (RIBA) that identifies antibodies which react with individual HCV antigens is often used as a supplemental test for confirmation of a positive EIA result. Testing for HCV circulating by amplification tests RNA (e.g. polymerase chain reaction or PCR, branched DNA assay) is also being utilized for confirmation of serological results as well as for assessing the effectiveness of antiviral therapy. A positive result indicates the presence of active infection and a potential for spread of the infection and or/the development of chronic liver disease.

Antiviral drugs such as interferon taken alone or in combination with ribavirin, can be used for the treatment of persons with chronic hepatitis C, but the cost of treatment is very high. Treatment with interferon alone is effective in about 10% to 20% of patients. Interferon combined with ribavirin is effective in about 30% to 50% of patients. Ribavirin does not appear to be effective when used alone.

There is no vaccine against HCV. Research is in progress but the high mutability of the HCV genome complicates vaccine development. Lack of knowledge of any protective immune response following HCV infection also impedes vaccine research. It is not known whether the immune system is able to eliminate the virus.

Some studies, however, have shown the presence of virus neutralizing antibodies in patients with HCV infection. In the absence of a vaccine, all precautions to prevent infection must be taken including (a) screening and testing of blood and organ donors; (b) Virus inactivation of plasma derived products; (c) implementation and maintenance of infection control practices in health care settings, including appropriate sterilization of medical and dental equipment; (d) promotion of behaviour change among the general public and health care workers to reduce overuse of injections and to use safe injection practices; and (e) Risk reduction counselling for persons with high-risk drug and sexual practices. “

The genome encodes for structural components, a nucleocapsid protein and two envelope glycoproteins, and functional constituents involved in the virus replication and protein processing. The nucleocapsid-encoding region seems to be the most conservative among the isolates obtained all over the world.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with HCV-specific antigens derived from “core” and “ns” regions encoding for conservative and immunodominant antigenic determinants (Core peptide, recombinant NS3, NS4 and NS5 peptides).

The solid phase is first treated with the diluted sample and HCV Ab are captured, if present, by the antigens.

After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound HCV antibodies, IgG and IgM as well, are detected by the addition of polyclonal specific anti hlgG&M antibodies, labelled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti HCV antibodies present in the sample. A cut-off value let optical densities be interpreted into HCV antibody negative and positive results.

D. COMPONENTS

Code CVAB.CE contains reagents for 192 tests.

1. Microplate **MICROPLATE**

n° 2 microplates

12 strips of 8 microwells coated with Core peptide, recombinant NS3, NS4 and NS5 peptides. Plates are sealed into a bag with desiccant.

2. Negative Control **CONTROL -**

1x4.0ml/vial. Ready to use control. It contains 1% goat serum proteins, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The negative control is olive green colour coded.

3. Positive Control **CONTROL +**

1x4.0ml/vial. Ready to use control. It contains 1% goat serum proteins, human antibodies positive to HCV, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The Positive Control is blue colour coded.

4. Calibrator **CAL ...**

n° 2 vials. Lyophilized calibrator. To be dissolved with the volume of EIA grade water reported on the label. It contains foetal bovine serum proteins, human antibodies to HCV whose content is calibrated on the NIBSC Working Standard code 99/588-003-WI, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.3 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

Note: The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label .

5. Wash buffer concentrate **WASHBUF 20X**

2x60ml/bottle. 20x concentrated solution. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

6. Enzyme Conjugate **CONJ**

2x16ml/vial. Ready to use and pink/red colour coded reagent. It contains Horseradish Peroxidase conjugated goat polyclonal antibodies to human IgG and IgM, 5% BSA, 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

7. Chromogen/Substrate **SUBS TMB**

2x16ml/vial. Ready-to-use component. It contains 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine or TMB and 0.02% hydrogen peroxide or H₂O₂.

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

8. Assay Diluent **DILAS**

1x15ml/vial. 10 mM tris buffered solution pH 8.0 +/-0.1 containing 0.045% ProClin 300 for the pre-treatment of samples and controls in the plate, blocking interference.

9. Sulphuric Acid **H₂SO₄ 0.3 M**

1x32ml/bottle. It contains 0.3 M H₂SO₄ solution. Attention: Irritant (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363)

10. Sample Diluent: **DILSPE**

2x50ml/bottle. It contains 1% goat serum proteins, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

Note: The diluent changes colour from olive green to dark bluish green in the presence of sample.

11. Plate sealing foils n° 4

12. Package insert n° 1

Important note: Only upon specific request , Dia.Pro can supply reagents for 96, 480, 960 tests , as reported below:

1. Microplate	n°1	n°5	n°10
2.NegativeControl	1x2.0ml/vial	1x10ml/vial	1x20.ml/vial
3.PositiveControl	1x2.0ml/vial	1x10ml/vial	1x20.ml/vial
4.Calibrator	n° 1 vial	n° 5 vials	n° 10 vials
5.Wash buff conc	1x60ml/bottle	5x60ml/bottles	4x150ml/bottles
6.Enz. Conjugate	1x16ml/vial	2x40ml/bottles	4x40ml/bottles
7.Chromog/Subs	1x16ml/vial	2x40ml/bottles	4x40ml/bottles
8.Assay Diluent	1x8ml/vial	1x40ml/bottle	1x80ml/bottle
9.Sulphuric Acid	1x15ml/vial	2x40ml/bottle	2x80ml/bottles
10.SampleDiluent	1x50ml/vial	5x50ml/bottles	4x125ml/bottles
11.Plate seal foils	n° 2	n° 10	n° 20
12. Pack. insert	n° 1	n° 1	n° 1
Number of tests	96	480	960
Code	CVAB.CE.96	CVAB.CE.480	CVAB.CE.960

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (200ul and 10ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (bidistilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator capable to provide a temperature of +37°C.
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. When the kit is used for the screening of blood units and blood components, it has to be used in a laboratory certified and qualified by the national authority in that field (Ministry of Health or similar entity) to carry out this type of analysis.
3. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
5. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-borne microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen/Substrate from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
6. Upon receipt, store the kit at 2.8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
7. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
8. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
9. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
10. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
11. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels.
12. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
13. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
14. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated

before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..

15. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
16. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water
17. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND RECOMMENDATIONS

1. Blood is drawn aseptically by venipuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate, generating false negative results.
3. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
4. Haemolysed (red) and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.
5. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for several months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
6. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-use of the device and up to 6 months.

1. Microplates:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of manufacturing. In this case call Dia.Pro's customer service. Unused strips have to be placed back into the aluminium pouch, in presence of desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°..8°C. When opened the first time, residual strips are stable till the indicator of humidity inside the desiccant bag turns from yellow to green.

2. Negative Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

3. Positive Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use. Handle this component as potentially infective, even if HCV, eventually present in the control, has been chemically inactivated.

4. Calibrator:

Dissolve carefully the content of the lyophilised vial with the volume of EIA grade water reported on its label. Mix well on vortex before use.

Handle this component as potentially infective, even if HCV, eventually present in the control, has been chemically inactivated.

Note: When dissolved the Calibrator is not stable. Store in aliquots at -20°C .

5. Wash buffer concentrate:

The 20x concentrated solution has to be diluted with EIA grade water up to 1200 ml and mixed gently end-over-end before use. As some salt crystals may be present into the vial, take care to dissolve all the content when preparing the solution.

In the preparation avoid foaming as the presence of bubbles could give origin to a bad washing efficiency.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at $+2..8^{\circ}\text{C}$.

6. Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

7. Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container.

8. Assay Diluent:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

9. Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

10. Sample Diluent:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of $\pm 2\%$. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at $+37^{\circ}\text{C}$ (tolerance of $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water

baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.

3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested). 5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing. An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of $\pm 5\%$.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth $\leq 10\text{ nm}$; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0 ; (c) linearity to ≥ 2.0 ; (d) repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section O "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended for blood screening when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
7. When using automatic devices, in case the vial holder of the instrument does not fit with the vials supplied in the kit, transfer the solution into appropriate containers and label them with the same label peeled out from the original vial. This operation is important in order to avoid mismatching contents of vials, when transferring them. When the test is over, return the secondary labeled containers to $2..8^{\circ}\text{C}$, firmly capped.
8. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label of the kit box. Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by naked-eye visible particles or aggregates. Check that the Chromogen/Substrate is colorless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile transparent plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box. Check that the

aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.

3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
4. Dissolve the Calibrator as described above.
5. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix as described.
6. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
7. Check that the ELISA reader has been turned on at least 20 minutes before reading.
8. If using an automated workstation, turn it on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
9. Check that the micropipettes are set to the required volume.
10. Check that all the other equipment is available and ready to use.
11. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

Automated assay:

In case the test is carried out automatically with an ELISA system, we suggest to make the instrument aspirate 200 ul Sample Diluent and then 10 ul sample.

All the mixture is then carefully dispensed directly into the appropriate sample well of the microplate. Before the next sample is aspirated, needles have to be duly washed to avoid any cross-contamination among samples.

Do not dilute controls/calibrator as they are ready to use.

Dispense 200 ul controls/calibrator in the appropriate control/calibration wells.

Important Note: Visually monitor that samples have been diluted and dispensed into appropriate wells. This is simply achieved by checking that the colour of dispensed samples has turned to dark bluish-green while the colour of the negative control has remained olive green.

For the next operations follow the operative instructions reported below for the Manual Assay.

It is strongly recommended to check that the time lap between the dispensation of the first and the last sample will be calculated by the instrument and taken into consideration by delaying the first washing operation accordingly.

Manual assay:

1. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the 1st well empty for the operation of blanking.
2. Dispense 200 ul of Negative Control in triplicate, 200 ul Calibrator in duplicate and 200 ul Positive Control in single in proper wells. Do not dilute Controls and Calibrator as they are pre-diluted, ready to use !
3. Add 200 ul of Sample Diluent (DILSPE) to all the sample wells; then dispense 10 ul sample in each properly identified well. Mix gently the plate, avoiding overflowing and contaminating adjacent wells, in order to fully disperse the sample into its diluent.

Important note: Check that the colour of the Sample Diluent, upon addition of the sample, changes from light green to dark bluish green, monitoring that the sample has been really added.

4. Dispense 50 ul Assay Diluent (DILAS) into all the controls/calibrator and sample wells. Check that the color of samples has turned to dark blue.
5. Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

6. Wash the microplate with an automatic washer by delivering and aspirating 350ul/well of diluted washing solution as reported previously (section I.3).
7. Pipette 100ul Enzyme Conjugate into each well, except the 1st blanking well, and cover with the sealer. Check that this pink/red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

8. Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.
9. Wash microwells as in step 6.
10. Pipette 100ul Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 15 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

11. Pipette 100ul Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 10 to stop the enzymatic reaction. Addition of acid will turn the positive control and positive samples from blue to yellow/brown.
12. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1 (mandatory).

Important notes:

1. Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.
2. Reading has to be carried out just after the addition of the Stop Solution and anyway not any longer than 20 minutes after its addition. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to high background.
3. Shaking at 350 ±150 rpm during incubation has been proved to increase the sensitivity of the assay of about 20%.
4. The Calibrator (CAL) does not affect the cut-off calculation and therefore the test results calculation. The Calibrator may be used only when a laboratory internal quality control is required by the management.

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Controls & Calibrator	200 ul
Samples	200ul dil.+10ul
Assay Diluent (DILAS)	50 ul
1st incubation	45 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 ul
2nd incubation	45 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H ₂ O ₂	100 ul
3rd incubation	15 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm / 620-630nm

An example of dispensation scheme is reported below:

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

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

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A check is carried out on the controls and the calibrator any time the kit is used in order to verify whether their OD450nm values are as expected and reported in the table below.

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
Negative Control (NC)	< 0.050 mean OD450nm value after blanking
Calibrator	S/Co > 1.1
Positive Control	> 1.000 OD450nm value

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

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

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Sustrate solution has not got contaminated during the assay
Negative Control (NC) > 0.050 OD450nm after blanking	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of negative control); 4. that no contamination of the negative control or of their wells has occurred due to positive

	samples, to spills or to the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
Calibrator S/Co < 1.1	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (ex.: dispensation of negative control instead of control serum) 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
Positive Control < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in the distribution of controls (dispensation of negative control instead of positive control. In this case, the negative control will have an OD450nm value > 0.150, too. 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

Should these problems happen, after checking, report any residual problem to the supervisor for further actions.

P. CALCULATION OF THE CUT-OFF

The tests results are calculated by means of a cut-off value determined with the following formula on the mean OD450nm value of the Negative Control (NC):

$$NC + 0.350 = \text{Cut-Off (Co)}$$

The value found for the test is used for the interpretation of results as described in the next paragraph.

Important note: When the calculation of results is done by the operative system of an ELISA automated work station be sure that the proper formulation is used to calculate the cut-off value and generate the right interpretations of results.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

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

S/Co	Interpretation
< 0.9	Negative
0.9 - 1.1	Equivocal
> 1.1	Positive

A negative result indicates that the patient has not been infected by HCV or that the blood unit may be transfused.

Any patient showing an equivocal result should be tested again on a second sample taken 1-2 weeks later from the patient and examined. The blood unit should not be transfused.

A positive result is indicative of HCV infection and therefore the patient should be treated accordingly or the blood unit should be discarded.

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the responsible of the laboratory to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. Any positive result should be confirmed by an alternative method capable to detect IgG and IgM antibodies (confirmation test) before a diagnosis of viral hepatitis is formulated.
3. As proved in the Performance Evaluation of the product, the assay is able to detect seroconversion to anti HCV core antibodies **earlier** than some other commercial kits. Therefore a positive result, not confirmed with these commercial kits, does not have to be ruled out as a false positive result ! The sample has to be anyway submitted to a confirmation test (supplied upon request by DiaPro srl, code CCONF).
4. As long as the assay is able to detect also IgM antibodies some discrepant results with other commercial products for the detection of anti HCV antibodies - lacking anti hIgM conjugate in the formulation of the enzyme tracer and therefore missing IgM reactivity - may be present. The real positivity of the sample for antibodies to HCV should be then confirmed by examining also IgM reactivity, important for the diagnosis of HCV infection.
5. When test results are transmitted from the laboratory to an informatics centre, attention has to be done to avoid erroneous data transfer.
6. Diagnosis of viral hepatitis infection has to be done and released to the patient only by a qualified medical doctor.

An example of calculation is reported below:

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

Negative Control: 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm

Mean Value: 0.020 OD450nm

Lower than 0.050 – Accepted

Positive Control: 2.189 OD450nm

Higher than 1.000 – Accepted

Cut-Off = 0.020+0.350 = 0.370

Calibrator: 0.550 - 0.530 OD450nm

Mean value: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4

S/Co higher than 1.1 – Accepted

Sample 1: 0.070 OD450nm

Sample 2: 1.690 OD450nm

Sample 1 S/Co < 0.9 = negative

Sample 2 S/Co > 1.1 = positive

R. PERFORMANCES

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what reported in the Common Technical Specifications or CTS (art. 5, Chapter 3 of IVD Directive 98/79/EC).

1. LIMIT OF DETECTION

The limit of detection of the assay has been calculated by means of the British Working Standard for anti-HCV, NIBSC code 99/588-003-WI. The table below reports the mean OD450nm values of this standard when diluted in negative plasma and then examined.

Dilution	Lot # 1	Lot # 2
Factor	S/Co	S/Co
1 X	2.0	2.0
2 X	1.1	1.2
4 X	0.7	0.8
8 X	0.5	0.5
Negative plasma	0.3	0.3

In addition the sample coded Accurun 1 – series 3000 - supplied by Boston Biomedica Inc., USA, has been evaluated "in toto" showing the results below:

CVAB.CE Lot ID	Accurun 1 Series	S/Co
1201	3000	1.5
0602	3000	1.5
1202	3000	1.9

In addition, n° 7 samples, tested positive for HCV Ab with Ortho HCV 3.0 SAvE, code 930820, lot. # EXE065-1, were diluted in HCV Ab negative plasma in order to generate limiting dilutions and then tested again on CVAB.CE, lot. # 1202, and Ortho.

The following table reports the data obtained.

Sample n°	Limit Dilution	CVAB.CE S/Co	Ortho 3.0 S/Co
1	256 X	1.9	1.3
2	256 X	1.9	0.7
3	256 X	2.4	1.0
4	128 X	2.5	3.2
5	85 X	3.3	1.4
6	128 X	2.2	0.8
7	135 X	3.2	2.2

2. DIAGNOSTIC SPECIFICITY AND SENSITIVITY

The Performance Evaluation of the device was carried out in a trial conducted on more than total 5000 samples.

2.1 Diagnostic specificity:

It is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of specific analyte. In addition to the first study, where a total of 5043 unselected blood donors, (including 1st time donors), 210 hospitalized patients and 162 potentially interfering specimens (other infectious diseases, E.coli antibody positive, patients affected by non viral hepatic diseases, dialysis patients, pregnant women, hemolized, lipemic, etc.) were examined, the diagnostic specificity was recently assessed by testing a total of 2876 negative blood donors on six different lots. A value of specificity of 100% was found.

No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed. Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the value of specificity. Frozen specimens have been tested, as well, to check for interferences due to collection and storage.

No interference was observed.

2.2 Diagnostic Sensitivity

It defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of specific analyte.

The diagnostic sensitivity has been assessed externally on a total number of 359 specimens; a diagnostic sensitivity of 100% was found. Internally more than other 50 positive samples were tested, providing a value of diagnostic sensitivity of again 100%. Positive samples from infections carried out by different genotypes of HCV were tested as well.

Furthermore, most of seroconversion panels available from Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) and Zeptometrix, USA, (HCV) have been studied.

Results are reported below for some of them.

Panel	N° samples	DiaPro*	Ortho* **
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Note: * Positive samples detected

** HCV v.3.0

Finally the Product has been tested on the panel EFS Ac HCV, lot n° 01/08.03.22C/01/A, supplied by the Etablissement Francais Du Sang (EFS), France, with the following results:

EFS Panel Ac HCV

Sample	Lot # 1 S/Co	Lot # 2 S/Co	Lot # 2 S/Co	Results expected
HCV 1	2.2	2.4	2.6	positive
HCV 2	1.6	2.0	2.1	positive
HCV 3	1.5	1.7	1.6	positive
HCV 4	5.2	6.5	5.5	positive
HCV 5	1.6	1.8	1.6	positive
HCV 6	0.4	0.4	0.4	negative

3. PRECISION:

It has been calculated on two samples, one negative and one low positive, examined in 16 replicates in three separate runs. Results are reported as follows:

Lot # 1202

Negative Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.094	0.099	0.096	0.096
Std.Deviation	0.008	0.007	0.008	0.007
CV %	8.7	6.6	7.9	7.7

Cal # 2 – 7K (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.396	0.403	0.418	0.406
Std.Deviation	0.023	0.029	0.027	0.026
CV %	5.9	7.1	6.4	6.5
S/Co	1.1	1.1	1.2	1.1

Lot # 0602

Negative Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average
OD 450nm	0.097	0.096	0.094	0.096
Std.Deviation	0.009	0.010	0.008	0.009
CV %	8.9	10.1	8.4	9.1

Cal # 2 – 7K (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.400	0.395	0.393	0.396
Std.Deviation	0.021	0.025	0.026	0.024
CV %	5.4	6.2	6.6	6.1
S/Co	1.2	1.2	1.1	1.2

Lot # 0602/2

Negative Sample (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average
OD 450nm	0.087	0.091	0.088	0.089
Std.Deviation	0.009	0.007	0.008	0.008
CV %	10.0	8.2	8.6	8.9

Cal # 2 – 7K (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average
OD 450nm	0.386	0.390	0.391	0.389
Std.Deviation	0.023	0.021	0.023	0.022
CV %	6.0	5.3	5.8	5.7
S/Co	1.1	1.2	1.2	1.2

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

S. LIMITATIONS

Repeatable false positive results, not confirmed by RIBA or similar confirmation techniques, were assessed as less than 0.1% of the normal population. Frozen samples containing fibrin particles or aggregates after thawing have been observed to generate some false results.

REFERENCES

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. MMWR 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. Hepatology 1997;26:2S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. Viral Hepatitis and Liver Disease, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. JAMA 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. Ann Intern Med 1972;77:691-9.

7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter, MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhoo MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB: Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter, MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes Srl.
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) - Italy



HCV Ab

**Versión 4.0 del Ensayo
Inmunoenzimático para la determinación
de anticuerpos frente Virus de la
Hepatitis C
en plasma y suero humanos.**

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro"



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

HCV Ab

A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

Versión 4.0 del Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos al virus de la Hepatitis C en plasma y suero humanos.

El equipo está diseñado para el cribado en unidades de sangre así como para el seguimiento de pacientes infectados con HCV. Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infección por el virus de la Hepatitis C como:

"La Hepatitis C es una infección viral del hígado, definida como hepatitis de transmisión parenteral "no A no B" hasta el descubrimiento del agente causal en 1989. El descubrimiento y la caracterización del virus de la hepatitis C (HCV) ha permitido comprender su papel primario en la hepatitis post-transfusional y su tendencia a inducir la infección persistente. El virus de la hepatitis C es la causa principal de hepatitis aguda y enfermedad hepática crónica, incluyendo cirrosis y cáncer de hígado. A nivel mundial se estima que 170 millones de personas estén infectadas de forma crónica con HCV y que de 3 a 4 millones se infecten cada año.

El virus se transmite por contacto directo con sangre humana. Las causas principales de infección por HCV en el mundo son las transfusiones sanguíneas no controladas y la reutilización de jeringuillas y agujas sin una correcta esterilización previa. En la actualidad aún no existe una vacuna eficaz contra el virus y el tratamiento para la hepatitis C crónica es demasiado costoso para la mayoría de las personas en países en vías de desarrollo. Desde una perspectiva global, el mayor impacto contra la hepatitis C puede lograrse a través de esfuerzos orientados hacia la prevención y el control de la transmisión por exposiciones nosocomiales (como las transfusiones sanguíneas y las prácticas invasoras inseguras) y los comportamientos que conllevan alto riesgo (como el consumo de drogas inyectables).

El virus de la hepatitis C aparece en la mayoría de los casos de hepatitis viral. Es un virus RNA envuelto, perteneciente a la familia Flaviviridae y que parece tener un estrecho margen de huéspedes. Humanos y chimpancés son las únicas especies susceptibles conocidas y ambas desarrollan una enfermedad similar. Una característica importante del virus es su variabilidad genómica, la cual pudiera estar relacionada a su elevada capacidad (80%) de inducir infección crónica. El HCV ha sido agrupado por genotipos, lo cual puede ser útil para determinar la gravedad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

El periodo de incubación varía desde 15 hasta 150 días. En la infección aguda los síntomas más comunes son fatiga e ictericia, sin embargo la mayoría de los casos (entre el 60% y el 70%), incluso aquellos que desarrollan la infección crónica, son asintomáticos. Cerca del 80% de los nuevos pacientes infectados progresan a la infección crónica. Del 10 al 20% de las personas con infección crónica desarrollan cirrosis, mientras que el cáncer de hígado lo presentan entre el 1 y el 5% de las personas con este tipo de infección, en un periodo de 20 a 30 años. Muchos pacientes que padecen cáncer de hígado y no están infectados por el virus de la hepatitis B, presentan evidencias de infección por el virus de la hepatitis C. Los mecanismos que relacionan la infección por HCV y el desarrollo de cáncer hepático no han sido aún esclarecidos. La hepatitis C puede exacerbar la gravedad de una enfermedad subyacente

del hígado cuando coexiste con otras disfunciones hepáticas; particularmente la enfermedad progresa más rápidamente en personas alcohólicas e infectadas por HCV. Las formas de transmisión más frecuentes son a través de transfusiones sanguíneas sin controlar y por la reutilización de agujas, jeringuillas y material médico contaminados. La transmisión sexual y perinatal puede suceder aunque es menos frecuente. Determinadas prácticas y comportamientos sociales y culturales (perforaciones en orejas y otras partes del cuerpo (piercing), circuncisiones y tatuajes) pueden constituir modos de transmisión si existe una inadecuada esterilización de los instrumentos usados. El HCV no se transmite por estornudos, tos, abrazos, agua o alimentos, estrechar la mano, compartir cubiertos o en general por contactos casuales. Tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, los grupos de alto riesgo incluyen drogadictos, receptores de transfusiones sin analizar, hemofílicos, pacientes sometidos a diálisis y personas con actividad sexual promiscua y sin la debida protección. En los países desarrollados, se ha estimado que el 90% de las personas con infección crónica por HCV son o han sido drogadictos o han recibido donaciones de sangre o hemoderivados contaminados. En muchos países en vías de desarrollo, donde aún se utilizan transfusiones o hemoderivados sin analizar, los principales medios de transmisión son los instrumentos para inyecciones y las transfusiones sin analizar.

La OMS estima que cerca de 170 millones de personas, es decir el 3% de la población mundial, están infectadas por el HCV y bajo riesgo de desarrollar cirrosis y/o cáncer hepático. La prevalencia de la infección por HCV en países de África, el Mediterráneo oriental, Sudeste Asiático y el Pacífico Occidental es alta, comparada con países de Norteamérica y Europa.

Las pruebas de diagnóstico para el HCV contribuyen a prevenir la infección mediante el cribado de la sangre y plasma del donante, son útiles para establecer un diagnóstico clínico y en el seguimiento de los pacientes. Las pruebas de diagnóstico comerciales disponibles en la actualidad, se basan en ensayos enzimáticos de inmunoabsorción (EIA) para la detección de anticuerpos específicos contra HCV. Estos métodos pueden detectar más del 95% de los pacientes con infección crónica, pero solo entre el 50 y el 70% de las infecciones agudas. Para confirmar los resultados positivos por EIA se usa frecuentemente el sistema inmunoblot recombinante (RIBA), el cual identifica anticuerpos contra los antígenos individuales del HCV. Por otra parte, algunas técnicas de biología molecular (amplificación de ácidos nucleicos: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y DNA ramificado) han sido utilizadas para confirmar los resultados serológicos así como para determinar la efectividad de la terapia antiviral. Un resultado positivo indica la presencia de una infección activa, de una fuente potencial de transmisión y/o del desarrollo de una enfermedad hepática crónica.

Para el tratamiento de personas con hepatitis C crónica se emplean fármacos antivirales como el interferón (administrado solo o en combinación con la ribavirina), pero el costo del tratamiento es elevado. Si se emplea solo el tratamiento con interferón, la eficacia en los pacientes es de 10 a 20%, mientras que en combinación con la ribavirina es eficaz en cerca del 30-50% de los casos. El tratamiento solo con ribavirina no parece ser efectivo.

No existe en la actualidad una vacuna contra HCV, debido en parte, a la alta frecuencia de mutaciones del virus. El escaso conocimiento de la respuesta inmune protectora que sigue a la infección por HCV ha dificultado el desarrollo de la vacuna. No se conoce tampoco acerca de los mecanismos del sistema inmune para la eliminación del virus. Algunos estudios, sin embargo, han demostrado la aparición de anticuerpos neutralizantes en pacientes con infección HCV. En ausencia de la vacuna, es conveniente tomar todas las medidas posibles para prevenir la infección (a) cribado y análisis de sangre y órganos de donantes; (b) inactivación del virus en productos derivados del plasma; (c) implementación y mantenimiento de las prácticas para el control de la infección incluyendo la

esterilización del material médico y dental; (d) promover cambios en la conducta entre el público en general y el personal sanitario para evitar las prácticas incorrectas y (e) vigilancia de los grupos de riesgo (personas con promiscuidad sexual y drogadictos)."

El genoma codifica para componentes estructurales: una proteína de la nucleocápside y dos glicoproteínas de la envoltura, así como para proteínas funcionales involucradas en la replicación viral y la síntesis de proteínas. La región que codifica para la nucleocápside parece estar altamente conservada entre los aislamientos obtenidos en todo el mundo.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

Las microplacas están recubiertas con antígenos específicos del HCV correspondientes a las regiones del "core" y "ns" que codifican para determinantes antígenicos inmunodominantes y conservados (péptido del core y péptidos recombinantes NS3, NS4 y NS5).

Se añade la muestra diluida y los anticuerpos contra HCV, presentes en la muestra, son capturados por los antígenos de la fase sólida.

Después del lavado, en la 2ª incubación, los anticuerpos IgG e IgM son detectados mediante anticuerpos policlonales específicos anti-IgG/IgM humanos, conjugados con Peroxidasa (HPR).

La enzima capturada en la fase sólida, combinada con la mezcla sustrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-HCV presentes en la muestra. Posteriormente, mediante un valor de corte calculado, las densidades ópticas pueden interpretarse como resultados negativos o positivos a la presencia de anticuerpos al HCV.

D. COMPONENTES.

Cada equipo (Código CVAB.CE) contiene reactivos suficientes para realizar 192 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLATE

n° 2 microplacas

12 tiras de 8 pocillos recubiertos con péptidos recombinantes para el "core" y para NS3, NS4 y NS5. Las placas están empaquetadas en bolsas selladas con desecante.

2. Control Negativo: CONTROL -

1x4.0ml/vial

Listo para el uso. Contiene 1% de proteínas del suero de cabra, tampón Citrato sódico 10mM pH 6.0 +/-0.1, 0.5% de Tween 20, además de azida sódica 0.09% y ProClin 300 al 0,045% como conservantes. El control negativo está codificado con el color verde olivo.

3. Control Positivo: CONTROL +

1x4.0ml/vial

Listo para el uso. Contiene 1% de proteínas del suero de cabra, anticuerpos humanos anti-HCV, tampón Citrato sódico 10mM pH 6.0 +/-0.1, 0.5% de Tween 20, así como azida sódica 0.09% y ProClin 300 al 0,045% como conservantes. El control positivo está codificado con el color azul.

4. Calibrador: CAL

n° 2 viales

Liofilizado. Para disolver en agua calidad EIA como se indica en la etiqueta. Contiene suero fetal bovino, anticuerpos humanos al HCV, calibrados según el código Estándar de Trabajo de NIBSC 99/588-003-VI, tampón Citrato sódico 10mM pH 6.0 +/-0.1, además de sulfato de gentamicina 0.3 mg/ml y ProClin 300 al 0,045% como conservantes.

Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del frasco varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen indicado en la etiqueta.

5. Tampón de Lavado Concentrado: WASHBUF 20X

2x60ml/botella. Solución concentrada 20x.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, Tween 20 al 0.05% y ProClin 300 al 0,045%.

6. Conjugado: CONJ

2x16ml/vial. Solución lista para el uso. Contiene 5% de albúmina de suero bovino, tampón Tris 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, anticuerpo policlonal de cabra anti-IgM/IgG humanos conjugado con peroxidasa (HPR) en presencia de 0.2 % de sulfato de gentamicina y ProClin 300 al 0,045% como conservantes. El conjugado está codificado con el color rosa/rojo.

7. Cromógeno/Substrato: SUBS TMB

2x16ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato-fosfato 50mM pH 3.5-3.8, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02% así como dimetilsulfóxido 4%.

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

8. Diluyente de ensayo: DILAS

1x15ml/vial. Contiene una solución tamponada Tris 10 mM pH 8.0 +/- 0.1 y 0.1% de ProClin 300 al 0,045% para el pre-tratamiento de muestras y controles, bloquea posibles interferencias.

Nota: Usar todo el contenido del vial antes de abrir un segundo. El reactivo es sensible a oxidación.

9. Ácido Sulfúrico: H₂SO₄ 0.3M

1x32ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0.3M

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

10. Diluyente de muestras: DILSPE

2x50ml. Contiene una solución tamponada citrato sódico 10 mM pH 6.0 +/- 0.1, 1% de proteínas del suero de cabra, 0.5% de Tween 20, azida sódica 0.09% y ProClin 300 al 0,045% como conservantes. Se usa para diluir las muestras.

11. Sellador adhesivo, n° 4

12. Manual de instrucciones, n° 1

Nota importante: A solicitud del cliente, Dia.Pro puede suministrar reactivos para realizar 96, 480 ó 960 pruebas, según se reporta a continuación:

1. Microplaca	n°1	n°5	n°10
2. Control Negativo	1x2.0ml/vial	1x10ml/vial	1x20. ml/vial
3. Control Positivo	1x2.0ml/vial	1x10ml/vial	1x20. ml/vial
4. Calibrador	n° 1 vial	n° 5 vials	n° 10 vials
5. Soluc. Lav. conc	1x60ml/bot.	5x60ml/frasc.	4x150ml/frasc.
6. Conjugado	1x16ml/vial	2x40ml/frasc.	4x40ml/frasc.
7. Cromóg/Subs	1x16ml/vial	2x40ml/frasc.	4x40ml/frasc.
8. Diluent. ensayo	1x8ml/vial	1x40ml/ frasc.	1x80ml/frasc.
9. Acido Sulfúrico	1x15ml/vial	2x40ml/ frasc.	2x80ml/frasc.
10. Diluent.muestr.	1x50ml/vial	5x50ml/frasc.	4x125ml/frasc.
11. Sellador adhes.	n° 2	n° 10	n° 20
12. Manual de instrucciones	n° 1	n° 1	n° 1
Número de pruebas	96	480	960
Código	CVAB.CE.96	CVAB.CE.480	CVAB.CE.960

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (200µl y 10µl) y puntas plásticas desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. *Timer* con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) fijo a 37°C.
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de filtros de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El equipo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Cuando el equipo es usado para cribado en unidades de sangre, el laboratorio debe estar certificado y calificado para realizar este tipo de análisis (Ministerio de Salud o entidad similar).
3. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar las ropas protectoras adecuadas de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
4. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
5. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los equipos, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del sustrato a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
6. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
7. No intercambiar reactivos de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos.
8. Comprobar que los reactivos no contienen precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
9. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
11. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en el equipo e internamente en los reactivos. Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en equipos abiertos, en uso por un período de hasta 6 meses.
12. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
13. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.

14. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.
15. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
16. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
17. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según las técnicas estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Evitar el uso de conservantes, en particular azida sódica, ya que pudiera afectar la actividad enzimática del conjugado, generando resultados falsos negativos.
3. Las muestras deben estar identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Cuando el equipo se emplea para el cribado en unidades de sangre, se recomienda el uso del código de barras.
4. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
5. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante varios meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
6. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en equipos abiertos, utilizados hasta 6 veces, en un período de hasta 6 meses.

1. Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación. De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas, deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el

desecante a 2-8°C. Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes, se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie de amarillo a verde.

2. Control Negativo:

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

3. Control Positivo:

Listo para el uso. Mezclar bien con la ayuda de un vórtex, antes de usar. Manipule este reactivo como potencialmente infeccioso, aunque las partículas virales presentes en el control han sido inactivadas químicamente.

4. Calibrador:

Disolver cuidadosamente el contenido del vial en el volumen de agua de calidad EIA indicado en la etiqueta. Mezclar bien con el vórtex antes de usar.

Manipule este reactivo como potencialmente infeccioso, aunque las partículas virales presentes en el control han sido inactivadas químicamente.

Nota: Una vez reconstituida, la solución no es estable. Se recomienda mantenerla congelada en alícuotas a -20°C.

5. Solución de Lavado Concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada fino a 1200 ml y mezclarse suavemente antes de usarse.

Por que en los frascos pueden estar presente los cristales, cuando se prepara la solución prestar mucha atención en diluir todo el contenido. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

6. Conjugado:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

7. Cromógeno/ Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

8. Diluyente de ensayo:

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

9. Ácido Sulfúrico:

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

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

Leyenda:

Indicación de peligro, **Frases H**

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, **Frases P**

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

10. Diluyente de muestras :

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

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

- Las micropipetas deben ser calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (lejía 10%, de calidad de los desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%. Deben descontaminarse periódicamente los residuos de los componentes del equipo.
- La incubadora de ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
- El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.
- Los tiempos de incubación deben tener un margen de ±5%.
- El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450 nm y de un segundo filtro de 620-630 nm, obligatorio para el blanco. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda ≤ 10 nm; b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2,0; c) Linealidad ≥ 2,0; d) Reproducibilidad ≥ 1%. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe calibrarse periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente se debe proceder al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
- En caso de usar un sistema automatizado de ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular

atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos por contaminación de los pocillos adyacentes por muestras fuertemente reactivas. Se recomienda el uso de sistemas automatizados para el cribado en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.

7. Cuando se utilizan instrumentos automáticos, en el caso en que los contenedores para los frascos del instrumento no sean adecuados a los frascos del kit, transferir la solución en ellos contenida en frascos idóneos al instrumento y etiquetarlos con la misma etiqueta utilizada en el frasco original. Esta operación es importante para evitar el cambio del contenido de los frascos durante el transferimiento. Cuando el test a terminado colocar los contenedores secundarios etiquetados y tapados a 2..8°C.
8. El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

1. Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del equipo (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Compruebe que los componentes líquidos no están contaminados con partículas o agregados visibles. Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico. Compruebe que no han ocurrido rupturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
3. Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
4. Disolver el Calibrador como se ha descrito anteriormente y mezclar suavemente.
5. Dejar los componentes restantes alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
6. Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y cebar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
7. Comprobar que el lector de ELISA esté conectado al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
8. En caso de trabajar automáticamente, conectar el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
9. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
10. Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
11. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

Ensayos Automatizados.

En el caso de que el ensayo se realice de manera automatizada con un sistema ELISA, se recomienda programar al equipo para aspirar 200µl de Diluyente de Muestras, y posteriormente 10µl de muestra.

La mezcla debe ser dispensada cuidadosamente en los pocillos correspondientes a cada muestra. Antes de aspirar la muestra siguiente, las agujas deben lavarse debidamente para evitar cualquier contaminación cruzada entre las muestras.

No diluir el Calibrador ni los controles ya que están listos para el uso.

Dispensar 200µl de controles/Calibrador en los pocillos correspondientes.

Nota importante: Controle a simple vista que las muestras han sido diluidas y dispensadas en los pocillos adecuados, para lo cual el color de las muestras dispensadas debe ser verde azul oscuro, mientras que el del control negativo debe permanecer verde olivo.

Para las operaciones siguientes, consulte las instrucciones que aparecen debajo para el Ensayo Manual.

Es muy importante comprobar que el tiempo entre el dispensado de la primera y la última muestra sea calculado por el instrumento y considerado para los lavados.

Ensayo Manual.

1. Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico. Dejar el primer pocillo vacío para el blanco.
2. Dispensar 200µl del Control Negativo, por triplicado, 200µl de Calibrador por duplicado y 200µl del Control Positivo. No diluir el Calibrador ni los controles ya que están listos para el uso!
3. Dispensar 200µl del Diluyente de muestras (DILSPE) a todos los pocillos de muestras, después dispensar 10 µl de cada muestra en su pocillo correspondiente. Resuspender suavemente evitando la formación de espuma y la contaminación de los pocillos adyacentes.

Nota importante: Comprobar que el color del Diluyente de muestras, después de adicionada la misma, cambia de verde a verde azul oscuro.

4. Dispensar 50 µl de Diluyente de ensayo (DILAS) en los pocillos de los controles/Calibrador y muestras. Compruebe que el color de las muestras sea azul oscuro.
5. Incubar la microplaca **45 min a +37°C**.

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

6. Lavar la microplaca con el lavador automático dispensando y aspirando 350 µl/pocillo de solución de lavado diluida, según según se indica (sección 1.3).
7. Dispensar 100µl del Conjugado en todos los pocillos, excepto en el A1 y cubrir con el sellador. Compruebe que este reactivo de color rosa/rojo ha sido añadido en todos los pocillos excepto el A1.

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

8. Incubar la microplaca **45 min a +37°C**.
9. Lavar la microplaca, de igual forma que en el paso 6.
10. Dispensar 100µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1. Incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) durante 15 minutos**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

11. Dispensar 100µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 10. La adición de la solución de parada cambia el color del Control Positivo y las muestras positivas de azul a amarillo/marrón.

12. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección I.5, con un filtro de 450 nm (lectura) y, otro de 620-630 nm (substracción del fondo), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco, obligatorio).

Notas importantes:

- Asegurarse de que no hay impresiones digitales ni polvo en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
- La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.
- Se ha probado que la agitación a 350 +/- 150 rpm, durante la incubación, aumenta en un 20% la sensibilidad del ensayo.
- El calibrador (CAL) no afecta al cálculo del valor de corte y, por lo tanto, no afecta al cálculo de los resultados de la prueba. El calibrador (CAL) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO.

Método	Operaciones
Controles & Calibrador	200 µl
Muestras	200µl dil.+10µl
Diluyente de ensayo (DILAS)	50 µl
1ª incubación	45 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado	100 µl
2ª incubación	45 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
TMB/H2O2	100 µl
3ª incubación	15 min
Temperatura	18-24°C
Acido Sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450nm / 620-630nm

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado.

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

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

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza un grupo de pruebas con los controles/calibrador cada vez que se usa el equipo para verificar si los valores DO450nm son los esperados.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Exigencia
Pocillo Blanco	Valor < 0.100 DO450nm
Control Negativo (CN)	Valor medio < 0.050 DO450nm después de leer el blanco
Calibrador	M/Co > 1.1
Control Positivo	Valor > 1.000 DO450nm

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

En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe:

Problema	Compruebe que
Pocillo blanco > 0.100DO450nm	la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
Control Negativo (CN) > 0.050 DO450nm después de leer el blanco	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido cebado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del control negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
Calibrador M/Co < 1.1	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el control negativo en lugar del calibrador). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
Control Positivo < 1.000 DO450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control negativo en lugar del positivo). En este caso el control negativo debe tener un valor de DO450nm > 0.150. 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si ocurre alguno de los problemas anteriores, después de comprobar, informe al responsable para tomar las medidas pertinentes.

P. CÁLCULO DEL VALOR DE CORTE.

Los resultados se calculan por medio de un valor de corte (cut-off) hallado con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de corte} = \text{CN medio DO450nm} + 0.350$$

El valor encontrado para el ensayo se usa para la interpretación de los resultados, según se describe a continuación:

Nota Importante: Cuando el cálculo de los resultados se halla mediante el sistema operativo de un equipo de ELISA automático, asegurarse de que la formulación usada para el cálculo del valor de corte, y para la interpretación de los resultados sea correcta.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

La interpretación de los resultados se realiza mediante la razón entre las DO a 450nm de las muestras y el Valor de corte (M/Co).

Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

(M/Co)	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9 – 1.1	Equívoco
> 1.1	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no está infectado por HCV y la unidad de sangre se puede transfundir. Cualquier paciente, cuya muestra resulte equívoca debe someterse a una nueva prueba con una segunda muestra de sangre colectada 1 ó 2 semanas después de la inicial. En este caso la unidad de sangre no debe ser transfundida. Un resultado positivo es indicativo de infección por HCV y por consiguiente el paciente debe ser tratado adecuadamente. La unidad de sangre debe ser descartada.

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Antes de formular un diagnóstico de hepatitis viral, los resultados positivos deben comprobarse a través de un método alternativo, capaz de detectar anticuerpos IgG e IgM (prueba confirmatoria).
3. Según se demuestra en la Evaluación del Performance del producto, el ensayo es capaz de detectar los anticuerpos anti HCV core, en etapas más tempranas en comparación con otros equipos comerciales. Sin embargo, un resultado positivo, no confirmado con estos equipos comerciales, no debe necesariamente considerarse como falso positivo! Es necesario realizar una prueba de confirmación (suministrada, bajo solicitud del cliente, por Dia.pro srl. Codificada CCONF).
4. Como el ensayo es capaz de detectar además anticuerpos IgM, pueden presentarse resultados discrepantes (pérdida de reactividad IgM) con respecto a otros productos comerciales para la detección de anticuerpos anti-HCV. La positividad real de una muestra debe confirmarse probando la reactividad IgM, lo cual resulta muy importante para el diagnóstico de infección por HCV.
5. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
6. El diagnóstico de infección con un virus de la hepatitis debe ser evaluado y comunicado al paciente por un médico calificado.

A continuación, un ejemplo de los cálculos a realizar:

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

Control Negativo: 0.019 – 0.020 – 0.021 DO450nm
 Valor medio: 0.020 DO450nm
 Menor de 0.050 – Válido

Control Positivo: 2.189 DO450nm
 Mayor de 1.000 – Válido
 Valor de corte = 0.020+0.350 = 0.370

Calibrador: 0.550 - 0.530 DO450nm
 Valor medio: 0.540 DO450nm M/Co = 1.4
 M/Co Mayor de 1.1 – Válido

Muestra 1: 0.070 DO450nm
 Muestra 2: 1.690 DO450nm
 Muestra 1 M/Co < 0.9 = negativa
 Muestra 2 M/Co > 1.1 = positiva

R. FUNCIONAMIENTO.

La evaluación del funcionamiento ha sido realizada según lo reportado en las Especificaciones Técnicas Comunes (ETC) (art. 5, Capítulo 3 de las Directivas IVD 98/79/EC).

1. LÍMITE DE DETECCIÓN.

El límite de detección ha sido calculado por medio del estándar de trabajo británico anti-HCV NIBSC, código 99/558-003-WI). La siguiente tabla muestra los valores medios de DO450nm de este estándar diluido en plasma negativo y examinado:

Dilución	Lote # 1	Lote # 2
Factor	M/Co	M/Co
1 X	2.0	2.0
2 X	1.1	1.2
4 X	0.7	0.8
8 X	0.5	0.5
Plasma Negativo	0.3	0.3

Se evaluó además la muestra Accurun 1 –serie 3000– suministrado por Boston Biomedica Inc., Estados Unidos.

Los resultados son los siguientes:

CVAB.CE Lote ID	Accurun 1 Serie	M/Co
1201	3000	1.5
0602	3000	1.5
1202	3000	1.9

Por otra parte, un total de 7 muestras, positivas para HCVAb según Ortho HCV 3.0 SAVe, código 930820, lote # EXE065-1, fueron diluidas en plasma negativo a HCVAb con el fin de obtener diluciones limitantes y luego fueron probadas nuevamente en CVAB.CE, lote # 1202, y Ortho.

Las tablas siguientes reflejan los resultados obtenidos:

Muestra n°	Dilución Límite	CVAB.CE M/Co	Ortho 3.0 M/Co
1	256 X	1.9	1.3
2	256 X	1.9	0.7
3	256 X	2.4	1.0
4	128 X	2.5	3.2
5	85 X	3.3	1.4
6	128 X	2.2	0.8
7	135 X	3.2	2.2

2. ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICAS.

La evaluación del procedimiento diagnóstico se realizó mediante un ensayo con más de 5000 muestras.

2.1 Especificidad Diagnóstica:

Se define como la probabilidad del ensayo de detectar negativos en ausencia del analito específico.

Además del primer estudio, donde se examinaron en total 5043 muestras de donantes de sangre no seleccionados, (incluyendo donantes por 1ª vez), 210 muestras de pacientes hospitalizados y 162 muestras que pudieran provocar interferencia (otras enfermedades infecciosas, positivas para anticuerpos de E. coli, pacientes con enfermedades hepáticas no virales, pacientes en diálisis, mujeres embarazadas, hemolizadas, lipémicas, etc.), la especificidad diagnóstica se evaluó recientemente examinando un total de 2876 muestras de donantes de sangre negativas en seis lotes distintos. Se observó un valor de especificidad de 100%.

Se emplearon además, plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrato, EDTA y heparina) y suero humanos. No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

Por último se analizaron muestras congeladas, para determinar posibles interferencias debidas a la toma de muestra y al almacenamiento. No se observaron interferencias.

2.2 Sensibilidad Diagnóstica.

Se define como la probabilidad del ensayo de detectar positivos en presencia del analito específico.

La sensibilidad diagnóstica ha sido estimada de forma externa en un total de 359 muestras, el valor obtenido fue de 100%. Más de 50 muestras positivas fueron probadas de forma interna, en este caso el resultado fue también de 100%.

Se evaluaron además, muestras positivas producto de infecciones por diferentes genotipos de HCV, así como también se estudió gran parte de los paneles de seroconversión de Boston Biomedica Inc (PHV) y Zeptometrix, USA (HCV), disponibles.

Los resultados para algunos de ellos se describen a continuación:

Panel	N° samples	DiaPro*	Ortho**
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Note: * Positive samples detected

** HCV v.3.0

Por último, el producto ha sido probado contra el panel EFS Ac HCV, lote n° 01/08.03.22C/01/A, suministrado por Etablissement Francais Du Sang (EFS), Francia, obteniéndose los siguientes resultados:

EFS Panel Ac HCV

Muestra	Lote # 1 M/Co	Lote # 2 M/Co	Lote# 3 M/Co	Resultados esperados
HCV 1	2.2	2.4	2.6	positivo
HCV 2	1.6	2.0	2.1	positivo
HCV 3	1.5	1.7	1.6	positivo
HCV 4	5.2	6.5	5.5	positivo
HCV 5	1.6	1.8	1.6	positivo
HCV 6	0.4	0.4	0.4	negativo

3. PRECISIÓN.

Ha sido calculada utilizando dos muestras, una negativa y una débil positiva, examinadas en 16 réplicas en tres corridas separadas.

Los resultados se muestran a continuación:

Lote # 1202

Muestra Negativa (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor Promedio
DO 450nm	0.094	0.099	0.096	0.096
Desviación estándar	0.008	0.007	0.008	0.007
CV %	8.7	6.6	7.9	7.7

Cal # 2 – 7K (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor Promedio
DO 450nm	0.396	0.403	0.418	0.406
Desviación estándar	0.023	0.029	0.027	0.026
CV %	5.9	7.1	6.4	6.5
M/Co	1.1	1.1	1.2	1.1

Lote # 0602

Muestra Negativa (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor Promedio
DO 450nm	0.097	0.096	0.094	0.096
Desviación estándar	0.009	0.010	0.008	0.009
CV %	8.9	10.1	8.4	9.1

Cal # 2 – 7K (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor Promedio
DO 450nm	0.400	0.395	0.393	0.396
Desviación estándar	0.021	0.025	0.026	0.024
CV %	5.4	6.2	6.6	6.1
M/Co	1.2	1.2	1.1	1.2

Lote # 0602/2

Muestra Negativa (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} corrida	2 ^{da} corrida	3 ^{ra} corrida	Valor Promedio
DO 450nm	0.087	0.091	0.088	0.089
Desviación estándar	0.009	0.007	0.008	0.008
CV %	10.0	8.2	8.6	8.9

Cal # 2 – 7K (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} corrida	2 ^{da} corrida	3 ^{ra} corrida	Valor Promedio
DO 450nm	0.386	0.390	0.391	0.389
Desviación estándar	0.023	0.021	0.023	0.022
CV %	6.0	5.3	5.8	5.7
M/Co	1.1	1.2	1.2	1.2

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

S. LIMITACIONES.

Los falsos positivos repetibles, no confirmados por RIBA o similares técnicas de confirmación, fueron estimados como menos del 0.1% de la población normal.

Las muestras que después de ser descongeladas presentan partículas de fibrina o partículas agregadas, generan algunos resultados falsos positivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. MMWR 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. Hepatology 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. Viral Hepatitis and Liver Disease, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. JAMA 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. Ann Intern Med 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. Lancet 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. Am J Med Sci 1975;270:355-62.

9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. N Engl J Med 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. Science 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. N Engl J Med 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. N Engl J Med 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. N Engl J Med 1992;327:1899-1905.
15. Alter, MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. Semin Liver Dis 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. Am J Epidemiol 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. West J Med 1992;156:30-5.
18. Fingerhuth MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. Arch Intern Med 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. Am J Pub Health 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. Blood 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. Blood 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. J Med Virology 1993;41:205-9.
23. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. ASAIO Journal 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. J Infect Dis 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB: Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. JAMA 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. J Infect Dis 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter, MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. J Infect 1994;29:263-9.

28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. J Infect Dis 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. Arch Intern Med 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. Infect Control Hosp Epidemiol 1992;13:82-5.

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el mercado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

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



0318

HBsAg_{one}

Version ULTRA

**Fourth generation Enzyme
Immunoassay (ELISA)
for the determination of
Hepatitis B surface Antigen or HBsAg
in human serum and plasma**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

Doc.:	INS SAG1ULTRA.CE/Eng	Page	2 of 9	Rev.:	5	Date:	2019/11
-------	----------------------	------	--------	-------	---	-------	---------

HBsAg One version ULTRA

A. INTENDED USE

Fourth generation Enzyme Immunoassay (ELISA) for the one-step determination of Hepatitis B surface Antigen or HBsAg in human plasma and sera.

The kit is intended for the screening of blood units, is able to detect HBsAg mutants and finds application in the follow-up of HBV-infected patients.

For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) defines Hepatitis B Virus infection as follows:

"Hepatitis B is one of the major diseases of mankind and is a serious global public health problem. Hepatitis means inflammation of the liver, and the most common cause is infection with one of 5 viruses, called hepatitis A,B,C,D, and E. All of these viruses can cause an acute disease with symptoms lasting several weeks including yellowing of the skin and eyes (jaundice); dark urine; extreme fatigue; nausea; vomiting and abdominal pain. It can take several months to a year to feel fit again. Hepatitis B virus can cause chronic infection in which the patient never gets rid of the virus and many years later develops cirrhosis of the liver or liver cancer.

HBV is the most serious type of viral hepatitis and the only type causing chronic hepatitis for which a vaccine is available. Hepatitis B virus is transmitted by contact with blood or body fluids of an infected person in the same way as human immunodeficiency virus (HIV), the virus that causes AIDS. However, HBV is 50 to 100 times more infectious than HIV. The main ways of getting infected with HBV are: (a) perinatal (from mother to baby at the birth); (b) child- to-child transmission; (c) unsafe injections and transfusions; (d) sexual contact.

Worldwide, most infections occur from infected mother to child, from child to child contact in household settings, and from reuse of un-sterilized needles and syringes. In many developing countries, almost all children become infected with the virus. In many industrialized countries (e.g. Western Europe and North America), the pattern of transmission is different. In these countries, mother-to-infant and child-to-child transmission accounted for up to one third of chronic infections before childhood hepatitis B vaccination programmes were implemented. However, the majority of infections in these countries are acquired during young adulthood by sexual activity, and injecting drug use. In addition, hepatitis B virus is the major infectious occupational hazard of health workers, and most health care workers have received hepatitis B vaccine.

Hepatitis B virus is not spread by contaminated food or water, and cannot be spread casually in the workplace. High rates of chronic HBV infection are also found in the southern parts of Eastern and Central Europe. In the Middle East and Indian sub-continent, about 5% are chronically infected. Infection is less common in Western Europe and North America, where less than 1% are chronically infected.

Young children who become infected with HBV are the most likely to develop chronic infection. About 90% of infants infected during the first year of life and 30% to 50% of children infected between 1 to 4 years of age develop chronic infection. The risk of death from HBV-related liver cancer or cirrhosis is approximately 25% for persons who become chronically infected during childhood. Chronic hepatitis B in some patients is treated with drugs called *interferon* or *lamivudine*, which can help some patients. Patients with cirrhosis are sometimes given liver transplants, with varying success. It is preferable to prevent this disease with vaccine than to try and cure it.

Hepatitis B vaccine has an outstanding record of safety and effectiveness. Since 1982, over one billion doses of hepatitis B vaccine have been used worldwide. The vaccine is given as a series of three intramuscular doses. Studies have shown that the vaccine is 95% effective in preventing children and adults from developing chronic infection if they have not yet been infected. In many countries where 8% to 15% of children used to become chronically infected with HBV, the rate of chronic infection has been reduced to less than 1% in immunized groups of children. Since 1991, WHO has called for all countries to add hepatitis B vaccine into their national immunization programs."

Hepatitis B surface Antigen or HBsAg is the most important protein of the envelope of Hepatitis B Virus, responsible for acute and chronic viral hepatitis.

The surface antigen contains the determinant "a", common to all the known viral subtypes, immunologically distinguished by two distinct subgroups (ay and ad).

The ability to detect HBsAg with high sensitive immunoassays in the last years has led to an understanding of its distribution and epidemiology worldwide and to radically decrease the risk of infection in transfusion.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

A mix of mouse monoclonal antibodies specific to the determinants "a", "d" and "y" of HBsAg is fixed to the surface of microwells. Patient's serum/plasma is added to the microwell together with a second mix of mouse monoclonal antibodies, conjugated with Horseradish Peroxidase (HRP) and directed against a different epitope of the determinant "a" and against "preS".

The specific immunocomplex, formed in the presence of HBsAg in the sample, is captured by the solid phase.

At the end of the one-step incubation, microwells are washed to remove unbound serum proteins and HRP conjugate.

The chromogen/substrate is then added and, in the presence of captured HBsAg immunocomplex, the colorless substrate is hydrolyzed by the bound HRP conjugate to a colored end-product. After blocking the enzymatic reaction, its optical density is measured by an ELISA reader.

The color intensity is proportional to the amount of HBsAg present in the sample.

The version ULTRA is particularly suitable for automated screenings and is able to detect "s" mutants.

D. COMPONENTS

The standard configuration contains reagents to perform 192 tests and is made of the following components:

1. Microplate **MICROPLATE**

n° 2. 12 strips of 8 breakable wells coated with anti HBsAg, affinity purified mouse monoclonal antibodies, specific to "a", "y" and "d" determinants, and sealed into a bag with desiccant.

2. Negative Control **CONTROL -**

1x4.0ml/vial. Ready to use control. It contains goat serum, 10 mM phosphate buffer pH 7.4+/-0.1, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The negative control is pale yellow color coded.

3. Positive Control **CONTROL +**

1x4.0ml/vial. Ready to use control. It contains goat serum, non infectious recombinant HBsAg, 10 mM phosphate buffer pH 7.4+/-0.1, 0.02% gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The positive control is color coded green.

4. Calibrator **CAL ...**

n° 2 vials. Lyophilized calibrator. To be dissolved with EIA grade water as reported in the label. Contains fetal bovine serum, non infectious recombinant HBsAg at 0.5 IU/ml (2nd WHO international standard for HBsAg, NIBSC code 00/588), 10 mM phosphate buffer pH 7.4+/-0.1, 0.02% gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

Note: The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label .

5. Wash buffer concentrate **WASHBUF 20X**

2x60ml/bottle. 20X concentrated solution. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

Doc.:	INS SAG1ULTRA.CE/Eng	Page	3 of 9	Rev.:	5	Date:	2019/11
-------	----------------------	------	--------	-------	---	-------	---------

6. Enzyme Conjugate Diluent CONJ DIL

2x16ml/vial. Ready to use and pink/red color coded reagent. It contains 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 1% normal mouse serum, 5% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives. The solution is normally opalescent.

7. Enzyme Conjugate CONJ 20X

2x1ml/vial. 20X concentrated reagent. It contains Horseradish Peroxidase (HRP) labeled mouse monoclonal antibodies to HBsAg, determinant "a" and "preS", 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 5% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

8. Chromogen/Substrate SUBS TMB

2x25ml/bottle. It contains a 50 mM citrate-phosphate buffered solution at pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine (TMB) and 0.02% hydrogen peroxide (H₂O₂).

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

9. Sulphuric Acid H₂SO₄ 0.3 M

1x25ml/bottle. It contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

Note: Attention: Irritant (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363)

10. Plate sealing foils n° 4

11. Package insert

Important note:

Only upon specific request, Dia.Pro can supply reagents for 96, 480, 960 tests, as reported below:

	N°1	N°5	N°10
Microplates	1x2ml/vial	1x10ml/vial	1x20ml/vial
Negative Control	1x2ml/vial	1x10ml/vial	1x20ml/vial
Positive Control	N° 1 vial	N° 5 vials	N° 10 vials
Calibrator	1x60ml/vial	5x60ml/vial	4x150ml/vial
Wash buffer concentrate	1x0.8ml/vial	1x4ml/vial	2x4ml/vial
Enzyme conjugate	1x16ml/vial	2x40ml/vial	2x80ml/vial
Conjugate Diluent	1x25ml/vial	3x42ml/vial	2x125ml/vial
Chromogen/Substrate	1x15ml/vial	2x40ml/vial	2x80ml/vial
Sulphuric Acid	N° 2	N° 10	N° 20
Plate sealing foils	N° 1	N° 1	N° 1
Package insert			
Number of tests	96	480	960
Code SAG1ULTRA.CE	96	480	960

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (150ul, 100ul and 50ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (double distilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator (dry or wet), capable to provide shaking at 1300 rpm+/-150, set at +37°C.
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

2. When the kit is used for the screening of blood units and blood components, it has to be used in a laboratory certified and qualified by the national authority in that field (Ministry of Health or similar entity) to carry out this type of analysis.

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

4. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.

5. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.

6. Upon receipt, store the kit at 2.8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.

7. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.

8. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.

9. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.

10. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.

11. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-use of the device and up to 6 months.

12. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

13. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.

14. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..

15. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.

16. The Stop Solution is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water

17. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

Doc.:	INS SAG1ULTRA.CE/Eng	Page	4 of 9	Rev.:	5	Date:	2019/11
-------	----------------------	------	--------	-------	---	-------	---------

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate, generating false negative results.
3. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
4. Haemolysed (red) and lipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as well as they could give rise to false positive results. Specimens with an altered pathway of coagulation, presenting particles after blood collection and preparation of serum/plasma as those coming from hemodialized patients, could give origin to false positive results.
5. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen sample should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
6. If some turbidity is present or presence of microparticles is suspected after thawing, filter the sample on a disposable 0.2-0.8µ filter to clean it up for testing or use the two-steps alternative method.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-uses of the device and up to 6 months.

1. Microplates:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant has not turned green, indicating a defect in conservation. In this case, call Dia.Pro's customer service. Unused strips have to be placed back inside the aluminum pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°...8°C. After first opening, remaining strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

2. Negative Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

3. Positive Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use. The positive control does not contain any infective HBV as it is composed of recombinant synthetic HBsAg.

4. Calibrator:

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilized powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex. The solution is not stable. Store the Calibrator frozen in aliquots at -20°C.

5. Wash buffer concentrate:

The 20x concentrated solution has to be diluted with EIA grade water up to 1200 ml and mixed gently end-over-end before use. As some salt crystals may be present into the vial, take care to dissolve all the content when preparing the solution. In the preparation avoid foaming as the presence of bubbles could give origin to a bad washing efficiency.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2...8° C.

6. Enzyme conjugate:

The working solution is prepared by diluting the 20X concentrated reagent into the Conjugate Mix well on vortex before use.

Avoid any contamination of the liquid with oxidizing chemicals, dust or microbes. If this component has to be transferred, use only plastic sterile disposable containers.

Important note: The working solution is not stable. Prepare only the volume necessary for the work of the day. As an example when the kit is used in combination with other instruments or manually, dilute 0.1 ml 20X Conjugate with 1.9 ml Conjugate Diluent into a disposable plastic vial and mix carefully before use.

7. Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well by end-over-end mixing.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. Do not expose to strong light, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, and if possible, sterile disposable container.

8. Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well by end-over-end mixing.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. **Micropipettes** have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (70% ethanol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample or the components of the kit. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of ±2%.
2. The **ELISA incubator** has to be set at +37°C (tolerance of ±1°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. In case of **shaking** during incubations, the instrument has to ensure 350 rpm ±150. Amplitude of shaking is very important as a wrong one could give origin to splashes and therefore to some false positive result.
4. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with

Doc.:	INS SAG1ULTRA.CE/Eng	Page	5 of 9	Rev.:	5	Date:	2019/11
-------	----------------------	------	--------	-------	---	-------	---------

deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).

5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.

An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.

5. **Incubation times** have a tolerance of $\pm 5\%$.
6. The **microplate reader** has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0 ; (c) linearity to ≥ 2.0 ; (d) repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer 's instructions.
7. When using **ELISA automated workstations**, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, shaking, data handling, etc.) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated by checking full matching the declared performances of the kit. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set paying particular attention to avoid carry over by the needles used for dispensing samples and for washing. The carry over effect must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells due to strongly reactive samples, leading to false positive results. The use of ELISA automated work stations is recommended for blood screening and when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
8. When using automatic devices, in case the vial holder of the instrument does not fit with the vials supplied in the kit, transfer the solution into appropriate containers and label them with the same label peeled out from the original vial. This operation is important in order to avoid mismatching contents of vials, when transferring them. When the test is over, return the secondary labeled containers to 2.8°C , firmly capped.
9. **Dia.Pro's customer service** offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure full compliance with the essential requirements of the assay. Support is also provided for the installation of new instruments to be used in combination with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label of the kit box. Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by naked-eye visible particles or aggregates. Check that the Chromogen/Substrate is colorless or pale blue. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box. Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
4. Dilute the 20X concentrated Enzyme Conjugate with its Diluent as reported.
5. Dissolve the Calibrator as described above.
6. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix as described.

7. Set the ELISA incubator at $+37^{\circ}\text{C}$ and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
8. Check that the ELISA reader has been turned on at least 20 minutes before reading.
9. If using an automated workstation, turn it on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
10. Check that the micropipettes are set to the required volume.
11. Check that all the other equipment is available and ready to use.
12. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

Automated assay:

In case the test is carried out automatically with an ELISA system, we suggest to make the instrument dispense first 150 ul controls & calibrator, then all the samples and finally 100 ul diluted Enzyme Conjugate.

For the pre-washing step (point 1 of the assay procedure) and all the next operations follow the operative instructions reported below for the Manual Assay.

It is strongly recommended to check that the time lap between the dispensation of the first and the last sample will be calculated by the instrument and taken into consideration by delaying the first washing operation accordingly.

Manual Assay:

1. Place the required number of strips in the plastic holder and wash them once to hydrate wells. Carefully identify the wells for controls, calibrator and samples.

Important note: *Pre washing (1 cycle: dispensation of 350ul/well of washing solution+ aspiration) is fundamental to obtain reliable and specific results both in the manual and in the automatic procedures. Do not omit it !*

2. Leave the A1 well empty for blanking purposes.
3. Pipette 150ul of the Negative Control in triplicate, 150ul of the Calibrator in duplicate and then 150ul of the Positive Control in single followed by 150ul of each of the samples.
4. Check for the presence of samples in wells by naked eye (there is a marked color difference between empty and full wells) or by reading at 450/620nm. (samples show OD values higher than 0.100).
5. Dispense 100ul diluted Enzymatic Conjugate in all wells, except for A1, used for blanking operations.

Important note: *Be careful not to touch the inner surface of the well with the pipette tip when the conjugate is dispensed. Contamination might occur.*

6. Following addition of the conjugate, check that the color of the samples have changed from yellowish to pink/red and then incubate the microplate for **120 min at $+37^{\circ}\text{C}$** .

Important notes:

- a. *Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, only when the test is performed manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.*
- b. *If the procedure is carried out on shaking, be sure to deliver the rpm reported for in Section I.3 as otherwise intra-well contamination could occur.*

- When the first incubation is over, wash the microwells as previously described (section I.4)
- Pipette 200 µl Chromogen/Substrate into all the wells, A1 included.

Important note: Do not expose to strong direct light as a high background might be generated.

- Incubate the microplate protected from light at **18-24°C for 30 min**. Wells dispensed with the positive control, the calibrator and positive samples will turn from clear to blue.
- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells to stop the enzymatic reaction, using the same pipetting sequence as in step 8. Addition of the acid solution will turn the positive control, the calibrator and positive samples from blue to yellow/brown.
- Measure the color intensity of the solution in each well, as described in section I.6 using a 450nm filter (reading) and a 620-630nm filter (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

Important general notes:

- Ensure that no fingerprints or dust are present on the external bottom of the microwell before reading. They could generate false positive results on reading.
- Reading should ideally be performed immediately after the addition of the acid solution but definitely no longer than 20 minutes afterwards. Some self-oxidation of the chromogen can occur leading to a higher background.
- When samples to be tested are not surely clean or have been stored frozen, the assay procedure reported below is recommended as long as it is far less sensitive to interferences due to hemolysis, hyperlipaemia, bacterial contamination and fibrin microparticles. The assay is carried out in two-steps at +37°C on shaking at 350 rpm ± 150 as follows:
 - dispense 100 µl of controls, calibrator and samples
 - incubate 60 min at +37°C on shaking
 - wash according to instructions (section I.4)
 - dispense 100 µl diluted enzyme tracer
 - incubate 30 min at +37°C on shaking
 - wash
 - dispense 100 µl TMB&H₂O₂ mix
 - incubate 30 min at r.t. on shaking
 - stop and read

In this procedure the pre-wash can be omitted.
This method shows performances similar to the standard one and therefore can be used in alternative.
- The Calibrator (CAL) does not affect the cut-off calculation and therefore the test results calculation. The Calibrator may be used only when a laboratory internal quality control is required by the management.

N. ASSAY SCHEME

Operations	Procedure
Pre-Washing step	n° 1 cycle
Controls&Calibrator&samples	150 µl
Diluted Enzyme Conjugate	100 µl
1st incubation	120 min
Temperature	+37°C
Washing steps	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Chromogen/Substrate	200µl
2nd incubation	30 min
Temperature	room
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm / 620-630nm

An example of dispensation scheme is reported in the following section:

Microplate

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

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

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A check is performed on the controls/calibrator any time the kit is used in order to verify whether the expected OD_{450nm} or S/Co values have been matched in the analysis.

Ensure that the following results are met:

Parameter	Requirements
Blank well	< 0.100 OD _{450nm} value
Negative Control (NC)	< 0.050 mean OD _{450nm} value after blanking
Calibrator 0.5 IU/ml	S/Co > 2
Positive Control	> 1.000 OD _{450nm} value

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

If they do not, do not proceed any further and perform the following checks:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD _{450nm}	1. that the Chromogen/Substrate solution has not become contaminated during the assay
Negative Control (NC) > 0.050 OD _{450nm} after blanking	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative control or of the wells where the control was dispensed has occurred due to spills of positive samples or of the enzyme conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

Calibrator S/Co < 2	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution (ex.: dispensation of negative control instead of calibrator) 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
Positive Control < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during the distribution of the control (dispensation of negative control instead of positive control. In this case, the negative control will have an OD450nm value > 0.050). 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

If any of the above problems have occurred, report the problem to the supervisor for further actions.

Important note:

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

P. CALCULATION OF THE CUT-OFF

The test results are calculated by means of a cut-off value determined on the mean OD450nm/620-630nm value of the negative control (NC) with the following formula:

$$NC + 0.050 = \text{Cut-Off (Co)}$$

The value found for the test is used for the interpretation of results as described in the next paragraph.

Important note: When the calculation of results is performed by the operating system of an ELISA automated work station, ensure that the proper formulation is used to calculate the cut-off value and generate the correct interpretation of results.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

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

S/Co	Interpretation
< 0.9	Negative
0.9 – 1.1	Equivocal
> 1.1	Positive

A negative result indicates that the patient is not infected by HBV and that the blood unit may be transfused.

Any patient showing an equivocal result should be retested on a second sample taken 1-2 weeks after the initial sample; the blood unit should not be transfused.

A positive result is indicative of HBV infection and therefore the patient should be treated accordingly or the blood unit should be discarded.

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. Any positive result must be confirmed first by repeating the test on the sample, after having filtered it on 0.2-0.8 µ filter to remove any microparticles interference. Then, if still positive, the sample has to be submitted to a confirmation test before a diagnosis of viral hepatitis is released.
3. When test results are transmitted from the laboratory to another department, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
4. Diagnosis of viral hepatitis infection has to be taken and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

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

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

Negative Control: 0.012 – 0.008 – 0.010 OD450nm
Mean Value: 0.010 OD450nm
Lower than 0.050 – Accepted
Positive Control: 2.489 OD450nm
Higher than 1.000 – Accepted
Cut-Off = 0.010+0.050 = 0.060
Calibrator: 0.350 - 0.370 OD450nm
Mean value: 0.360 OD450nm S/Co = 6.0
S/Co higher than 2.0 – Accepted
Sample 1: 0.028 OD450nm
Sample 2: 1.690 OD450nm
Sample 1 S/Co < 0.9 = negative
Sample 2 S/Co > 1.1 = positive

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what reported in the Common Technical Specifications or CTS (art. 5, Chapter 3 of IVD Directive 98/79/EC). Version ULTRA proved to be at least equivalent to the original design in a study conducted for the validation of the new version.

1. Analytical Sensitivity

The limit of detection of the assay has been calculated on the 2nd WHO international standard, NIBSC code 00/588.

In the following table, results are given for three lots (P1, P2 and P3) of the version ULTRA in comparison with the reference device (Ref.):

WHO IU/ml	Lot # P1 S/Co	Lot # P2 S/Co	Lot # P3 S/Co	Ref. S/Co
0.4	4.6	4.8	4.6	4.6
0.2	2.3	2.4	2.4	2.4
0.1	1.4	1.4	1.5	1.2
0.05	0.8	0.8	1.0	0.7
0.025	0.6	0.6	0.6	0.4
FCS (NC)	0.3	0.2	0.3	0.1

The assay shows an Analytical Sensitivity better than 0.1 WHO IU/ml of HBsAg.

In addition two panels of sensitivity supplied by EFS, France, and by SFTS, France, were tested and gave in the best conditions the following results:

Panel EFS Ag HBs HB1-HB6 lot n° 04

Sample ID	Characteristics	ng/ml	S/Co
HB1	diluent	/	0,2
HB2	adw2+ayw3	0.05	0,6
HB3	adw2+ayw3	0.1	1,0
HB4	adw2+ayw3	0.2	1,8
HB5	adw2+ayw3	0.3	2,4
HB6	adw2+ayw3	0.5	4,2

Sensitivity panel SFTS, France, Ag HBs 2005

Sample ID	Characteristics	ng/ml	S/Co
171	Adw2 + ayw3	2.21 ± 0.15	15,4
172	Adw2 + ayw3	1.18 ± 0.10	8,7
173	Adw2 + ayw3	1.02 ± 0.05	6,1
174	Adw2 + ayw3	0.64 ± 0.04	4,0
175	Adw2 + ayw3	0.49 ± 0.03	3,4
176	Adw2 + ayw3	0.39 ± 0.02	2,6
177	Adw2 + ayw3	0.25 ± 0.02	2,0
178	Adw2 + ayw3	0.11 ± 0.02	1,3
179	Adw2 + ayw3	0.06 ± 0.01	0,9
180	Adw2 + ayw3	0.03 ± 0.01	0,8
181	Adw2	0.5 – 1.0	4,7
182	Adw4	0.5 – 1.0	3,6
183	Adr	0.5 – 1.0	4,5
184	Ayw1	0.5 – 1.0	5,1
185	Ayw2	0.5 – 1.0	6,4
186	Ayw3	0.5 – 1.0	7,3
187	Ayw3	0.5 – 1.0	5,8
188	Ayw4	0.5 – 1.0	6,9
189	Ayr	0.5 – 1.0	6,1
190	diluent	/	0,6

The panel # 808, supplied by Boston Biomedical Inc., USA, was also tested to define the limit of sensitivity.
Results in the best conditions are as follows :

BBI panel PHA 808

Sample ID	Characteristics	ng/ml	S/Co
01	ad	2,49	10,2
02	ad	1,17	4,8
03	ad	1,02	4,3
04	ad	0,96	3,8
05	ad	0,69	2,9
06	ad	0,50	2,2
07	ad	0,41	1,5
08	ad	0,37	1,3
09	ad	0,30	1,2
10	ad	0,23	1,0
11	ay	2,51	11,2
12	ay	1,26	5,9
13	ay	0,97	4,1
14	ay	0,77	3,7
15	ay	0,63	2,0
16	ay	0,48	2,4
17	ay	0,42	2,0
18	ay	0,33	1,8
19	ay	0,23	1,6
20	ay	0,13	1,1
21	negative	/	0,6

2. Diagnostic Sensitivity:

The diagnostic sensitivity was tested according to what required by Common Technical Specifications (CTS) of the directive 98/79/EC on IVD for HBsAg testing.
Positive samples, including HBsAg subtypes and a panel of “s” mutants from most frequent mutations, were collected from

different HBV pathologies (acute, a-symptomatic and chronic hepatitis B) or produced synthetically, and were detected positive in the assay.

All the HBsAg known subtypes, “ay” and “ad”, and isoforms “w” and “r”, supplied by CNTS, France, were tested in the assay and determined positive by the kit as expected.

An overall value of 100% has been found in a study conducted on a total number of more than 400 samples positive with the original reference IVD code SAG1.CE, CE marked.

A total of 30 sero-conversions were studied, most of them produced by Boston Biomedica Inc., USA.

Results obtained by examining eight panels supplied by Boston Biomedica Inc., USA, are reported below for the version ULTRA in comparison with the reference device code SAG1.CE.

Panel ID	1st sample positive	HBsAg subtype	HBsAg ng/ml	Version ULTRA S/Co	Ref. device S/Co
PHM 906	02	ad	0.5	3,7	1,4
PHM 907 (M)	06	ay	1.0	4,4	2,9
PHM 909	04	ad	0.3	1,2	0.8
PHM 914	04	ad	0.5	1,1	1,1
PHM 918	02	ad	0.1	1,8	0.5
PHM 923	03	ay	< 0.2	2,2	1,2
PHM 925	03	Ind.	n.d.	1,4	0.9
PHM 934	01	ad	n.d.	1,0	0.8

3. Diagnostic Specificity:

It is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of specific analyte. In addition to the first study, where more than 5000 negative samples from blood donors (two blood centers), classified negative with a CE marked device in use at the laboratory of collection were examined, the diagnostic specificity was recently assessed by testing a total of 2288 negative blood donors on seven different lots. A value of specificity of 100% was found.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the specificity.

No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed.

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

Samples derived from patients with different viral (HCV, HAV) and non viral pathologies of the liver that may interfere with the test were examined. No cross reaction were observed.

4. Precision:

It has been calculated for the version ULTRA on two samples examined in 16 replicates in 3 different runs for three lots.

Results are reported in the following tables:

Average values Total n = 144	Negative Sample	Calibrator 0.5 IU/ml
OD450nm	0.026	0.332
Std.Deviation	0.004	0.027
CV %	16%	8%

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

Doc.:	INS SAG1ULTRA.CE/Eng	Page	9 of 9	Rev.:	5	Date:	2019/11
-------	----------------------	------	--------	-------	---	-------	---------

S. LIMITATIONS

Repeatable false positive results were assessed on freshly collected specimens in less than 0.1% of the normal population, mostly due to high titers Heterophilic Anti Mouse Antibodies (HAMA).

Interferences in fresh samples were also observed when they were not particles-free or were badly collected (see chapter G). Old or frozen samples, presenting fibrin clots, cryoglobulins, lipid-containing micelles or microparticles after storage or thawing, can generate false positive results.

REFERENCES

1. Aach R.D., Grisham J.W., Parker S.W.. Detection of Australia antigen by radioimmunoassay. Proc.Natl.Acad.Sci..USA, 68:1956, 1971.
2. Blumerg B.S., Suinick A.I., London W.T.. Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen. Bull.N.Y.Acad.Med.. 44:1566, 1968.
3. Boniolo A., Dovis M., Matteja R.. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for screening hybridoma antibodies against hepatitis B surface antigen. J.Immunol.Meth.. 49:1, 1982.
4. Caldwell C.W., Barpet J.T.. Enzyme immunoassay for hepatitis B and its comparison to other methods. Cli.Chim.Acta 81: 305, 1977
5. Fazekas S., De St.Groth, Scheidegger D.. production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J.Immunol.Meth.. 35: 1, 1980
6. Reesink H.W.. et al.. Comparison of six 3rd generation tests for the detection of HBsAg. Vox.Sang.. 39:61, 1980
7. Rook G.A.W.. Chromogens for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using horseradish peroxidase. Lepr.Rev. 52: 281, 1981
8. Schroder J.. Monoclonal antibodies: a new tool for reasearch and immunodiagnostic. Med.Biol.. 58: 281, 1981
9. Coleman PF, Chen YC, Mushahwar IK. Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants. J.Med.Virol. 1999;59(1):19-24

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:

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

CE
0318

HBsAg_{one}

Versión ULTRA

**Ensayo inmunoenzimático de cuarta
generación (ELISA)
para la determinación de
antígeno de superficie de la hepatitis B o
HBsAg
en plasma y suero humanos**

- Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro"-



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G.Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
Milán - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF SAG1ULTRA.CE
96/192/480/960 pruebas

Doc.:	INS SAG1ULTRA.CE/Esp	Página	2 de 9	Rev.:	5	Fecha:	2019/11
-------	----------------------	--------	--------	-------	---	--------	---------

HBsAg One versión ULTRA

A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

Ensayo inmunoenzimático de cuarta generación (ELISA) para la determinación en un paso del antígeno de superficie de la hepatitis B o HBsAg en plasma y suero humanos.

El equipo está diseñado para el cribado en unidades de sangre, es capaz de detectar mutantes de HBsAg y puede aplicarse al seguimiento de pacientes infectados con HBV.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infección con virus de hepatitis B del siguiente modo:

"La Hepatitis B es una de las enfermedades más importantes que aquejan a la humanidad y constituye un problema de salud pública global. El término hepatitis significa inflamación del hígado y la causa más común es la infección por uno de los cinco virus, denominados A, B, C, D y E. Estos virus pueden causar una enfermedad aguda cuyos síntomas persisten por varias semanas, se caracterizan por el color amarillo de la piel y los ojos (ictericia); orina oscura; fatiga extrema; náuseas; vómitos y dolor abdominal. La recuperación puede tardar de varios meses a un año. Los virus de la Hepatitis son causantes de infecciones crónicas en las que el paciente nunca se libera del virus e incluso, años más tarde, desarrolla cirrosis hepática o cáncer de hígado.

El tipo más serio de hepatitis viral es la causada por el HBV, siendo el único tipo, de los que provocan infección crónica, para el cual existe una vacuna disponible. El virus de la Hepatitis B se transmite por contacto con sangre o fluidos corporales de personas infectadas, de la misma forma que el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), agente causal del SIDA. Sin embargo, el HBV es entre 50 y 100 veces más infeccioso que el HIV. Las principales vías de transmisión del HBV son: (a) vía perinatal (transmisión de madre a hijo durante el parto); (b) de niño a niño; (c) mediante inyecciones y transfusiones inseguras (d) por contacto sexual.

A nivel mundial, la mayor parte de las infecciones ocurre de madre infectada a hijo, de niño a niño en hogares y por la reutilización de agujas y jeringuillas sin previa esterilización. En muchos países en desarrollo, casi todos los niños se infectan con el virus. En muchos países desarrollados (Europa Occidental y Norteamérica), el patrón de transmisión es diferente. En estos países, la transmisión de madre a hijo y de niño a niño representaban cerca de un tercio de las infecciones crónicas antes de que se implantara el programa de vacunación infantil. Sin embargo, la mayoría de las infecciones en estos países se adquiere por la actividad sexual durante la adolescencia, y por el consumo de drogas inyectables. Por otra parte, el virus de la hepatitis B constituye el principal riesgo en el trabajo, dentro del colectivo de los profesionales de la salud, motivo por el cual se ha aplicado la vacunación para la protección de los mismos.

El virus de la hepatitis B no se transmite por la comida o agua contaminadas, ni por contactos casuales en el ámbito laboral. En zonas del Este y Centro de Europa se han encontrado tasas elevadas de infección crónica por HBV. En el Asia Central y en regiones de la India, aproximadamente el 5% de la población está infectada de forma crónica, mientras que en Europa Occidental y Norteamérica, los índices son menores del 1%.

Los niños infectados con HBV, constituyen el grupo más susceptible a la infección crónica. Aproximadamente el 90% de los niños infectados durante el primer año de vida y entre el 30 y el 50% de los niños infectados entre 1 y 4 años, desarrollan este tipo de infección. La mortalidad por cáncer de hígado o cirrosis asociados al HBV es cerca del 25%, entre las personas que han adquirido la infección crónica en la niñez. En ciertos pacientes, la hepatitis B crónica es tratada con interferones o lamivudinas, lo cual puede ayudar en ocasiones. En algunos casos de cirrosis se han realizado trasplantes de hígado, pero el resultado ha sido variable. La prevención de esta enfermedad a través de la vacunación constituye la mejor opción.

La vacuna contra la Hepatitis B tiene índices de seguridad y eficacia demostrados. A partir de 1982, han sido administradas mundialmente alrededor de mil millones de dosis. Se aplica por vía intramuscular en series de tres dosis. Los estudios realizados demuestran un 95% de

eficacia en la prevención de la infección crónica en niños y adultos sin infección previa. En muchos países donde el índice de infección crónica en niños oscila entre 8% y 15%, se ha observado una reducción a menos del 1% en grupos de niños inmunizados. Desde 1991, la OMS ha hecho un llamamiento para la introducción de la vacuna contra la hepatitis B en todos los programas nacionales de vacunación."

El antígeno de superficie de la hepatitis B o HBsAg es la proteína más importante de la envoltura del virus, responsable de las hepatitis virales agudas y crónicas.

Contiene el determinante "a", común a todos los subtipos virales conocidos, dividido inmunológicamente en dos subgrupos distintos (ay y ad).

En los últimos años la posibilidad de detectar el HBsAg mediante inmunoensayos altamente sensibles, ha permitido comprender su distribución y epidemiología en el mundo así como la gran disminución del riesgo de infección por transfusiones.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

La superficie de los pocillos está recubierta con una mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón específicos para los determinantes "a", "d" e "y" de HBsAg. El suero/plasma del paciente se adiciona al pocillo conjuntamente a una segunda mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón conjugada con peroxidasa (HRP) y dirigido contra un epitopo diferente del determinante "a" y contra "preS".

El inmunocomplejo específico, formado en presencia del HBsAg de la muestra, queda capturado en la fase sólida.

Terminada la incubación de un solo paso, los pocillos son lavados para eliminar las proteínas séricas no ligadas y el conjugado HRP.

Después se añade el sustrato/ cromogénico, que en presencia del inmunocomplejo de HBsAg capturado, el sustrato incoloro es hidrolizado por el conjugado HRP unido, generando un producto final coloreado. Después de bloquear la reacción enzimática, su densidad óptica se mide en un lector ELISA.

La intensidad del color es proporcional a la cantidad de HBsAg presente en la muestra.

La versión ULTRA es especialmente idónea para cribados automatizados y es capaz de detectar mutantes "s".

D. COMPONENTES.

La configuración estándar contiene reactivos suficientes para realizar 192 pruebas y está formada por los siguientes componentes:

1. Microplaca **MICROPLATE**

n° 2. 12 tiras de 8 pocillos rompibles recubiertos con anticuerpos monoclonales de ratón, purificados por afinidad, anti HBsAg, específicos para determinantes "a", "y" y "d" en una bolsa sellada con desecante.

2. Control negativo **CONTROL -**

1x4.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene suero de cabra, tampón fosfato 10 mM pH 7.4 +/- 0.1, así como azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes. El control negativo está codificado con color amarillo pálido.

3. Control positivo **CONTROL +**

1x4.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene suero de cabra, HBsAg recombinante, no infeccioso, tampón fosfato 10 mM pH 7.4 +/- 0.1, además de sulfato de gentamicina 0.02% y ProClin 300 0.045% como conservantes. El control positivo está codificado con el color verde.

4. Calibrador **CAL**

n° 2 viales. Calibrador liofilizado. Para disolver en agua calidad EIA como se indica en la etiqueta. Contiene suero fetal bovino, HBsAg recombinante no infeccioso a 0.5 IU/mL (2° Estándar internacional O.M.S. para HBsAg, NIBSC código

Doc.:	INS SAG1ULTRA.CE/Esp	Página	3 de 9	Rev.:	5	Fecha:	2019/11
-------	----------------------	--------	--------	-------	---	--------	---------

00/588), tampón fosfato 10 mM pH 7.4 +/- 0.1, así como sulfato de gentamicina 0.02% y ProClin 300 al 0.045% como conservantes.

Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del frasco varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen indicado en la etiqueta.

5. Solución de lavado concentrada **WASHBUF 20X**

2x60ml/botella. Solución concentrada 20X. Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, Tween 20 al 0.05% y ProClin 300 al 0.045%.

6. Diluyente de conjugado **CONJ DIL**

2x16ml/vial. Listo para el uso y reactivo codificado con color rosa/rojo. Contiene tampón Tris 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, 1% de suero de ratón normal, 5% de BSA, además 0.02% de sulfato de gentamicina y ProClin al 300 0.045% como conservantes. La solución es normalmente opalescente.

7. Conjugado **CONJ 20X**

2x1ml/vial. Reactivo concentrado 20X. Contiene anticuerpos monoclonales de ratón anti HBsAg marcados con peroxidasa (HRP), determinante "a" y preS", tampón Tris 10 mM a pH 6.8 +/- 0.1, 5% BSA, ProClin 300 al 0.045% y sulfato de gentamicina 0.02% como conservantes.

8. Cromógeno/substrato **SUBS TMB**

2x25ml/botella. Contiene solución tamponada citrato-fosfato 50 mM a pH 3.5-3.8, dimetilsulfóxido 4%, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02%.

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

9. Ácido sulfúrico **H₂SO₄ 0.3 M**

1x25ml/botella. Contiene solución de H₂SO₄ 0.3M
Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

10. Sellador adhesivo, n° 4

11. Manual de instrucciones

Nota importante:

A solicitud del cliente, Dia.Pro puede suministrar reactivos para 96, 480, 960 pruebas, como se describe a continuación:

Microplacas	N°1	N°5	N°10
Control negativo	1x2ml/vial	1x10ml/vial	1x20 ml/vial
Control Positivo	1x2ml/vial	1x10ml/vial	1x20 ml/vial
Calibrador	N° 1 vial	Viales n.º 5	Viales n.º 10
Solución de lavado concentrada	1x60ml/vial	5x60ml/vial	4x150ml/vial
Conjugado	1x0.8ml/vial	1x4ml/vial	2x4ml/vial
Diluyente de conjugado	1x16ml/vial	2x40ml/vial	2x80ml/vial
Cromógeno/substrato	1x25 ml/vial	3x42ml/vial	2x125ml/vial
Ácido Sulfúrico	1x15 ml/vial	2x40ml/vial	2x80ml/vial
Sellador adhesivo	N° 2	N° 10	N° 20
Manual de instrucciones	N° 1	N° 1	N° 1
Número de pruebas	96	480	960
Código SAG1ULTRA.CE	.96	.480	.960

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (150, 100 y 50 µl) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.

5. Incubador termostático de microplacas ELISA (en seco o húmedo), capaz de agitar a 1300 rpm +/- 150, ajustado a +37°C.
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El equipo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Cuando el equipo se utiliza para el cribado de unidades de sangre y componentes sanguíneos, debe utilizarse en un laboratorio certificado y homologado por la autoridad nacional en ese campo (Ministerio de Sanidad o entidad similar) para realizar dicho tipo de análisis.
3. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada de laboratorio, guantes sin talco y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (aguja). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
4. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
5. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire al abrir los viales del equipo y las microplacas, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno (TMB) a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
6. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
7. No intercambiar componentes de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos del mismo lote.
8. Comprobar que los reactivos no contengan precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
9. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
11. No usar el producto después de la fecha de vencimiento indicada en el equipo e internamente en los reactivos. En un estudio realizado con un equipo abierto no se ha detectado pérdida de actividad relevante utilizándolo hasta 6 veces y durante un período de hasta 6 meses.
12. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
13. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones cruzadas.
14. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser

Doc.:	INS SAG1ULTRA.CE/Esp	Página	4 de 9	Rev.:	5	Fecha:	2019/11
-------	----------------------	--------	--------	-------	---	--------	---------

inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.

15. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.

16. La solución de parada es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.

17. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.

2. Evitar la adición de conservantes a las muestras, en particular azida sódica, ya que podría afectar a la actividad enzimática del conjugado, generando resultados falsos negativos.

3. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Cuando el equipo se emplea para el cribado en unidades de sangre, se recomienda el uso del código de barras y la lectura electrónica.

4. Las muestras hemolizadas (color rojo) o lipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados. al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos porque pueden dar lugar a falsos positivos. Las muestras con una vía de coagulación alterada, que presentan partículas tras la extracción y preparación de suero/plasma y las que proceden de pacientes hemodializados, pueden originar resultados falsos positivos.

5. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.

6. Si hay algo de turbidez o se sospecha de la presencia de micropartículas tras descongelar, filtrar la muestra en un filtro de 0.2-0.8µm desechable para las pruebas o usar el método alternativo de dos pasos.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Estudios de estabilidad realizados en equipos en uso no han arrojado pérdida de actividad significativa en un período de hasta 6 meses.

1. Microplacas:

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

De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Cuando se abre por primera vez, las tiras sobrantes se mantienen estables hasta que el indicador de

humedad dentro de la bolsa del desecante cambia de amarillo a verde.

2. Control negativo:

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

3. Control positivo:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. El control positivo no contiene ningún HBV infeccioso ya que se compone de HBsAg recombinante sintético.

4. Calibrador:

Añadir al polvo liofilizado, el volumen de agua de calidad ELISA indicado en la etiqueta; dejar disolver completamente y después mezclar cuidadosamente con el vórtex antes de usar. Una vez reconstituida, la solución no es estable. Se recomienda mantenerla congelada en alícuotas a -20°C.

5. Solución de lavado concentrada:

La solución concentrada 20x debe diluirse con agua de calidad EIA hasta 1200 ml y mezclarse suavemente antes del uso. Dado que pueden existir algunos cristales de sal en el vial, debe prestarse atención a que todo el contenido quede disuelto al preparar la solución.

Durante la preparación hay que evitar la formación de espuma y burbujas, que podrían reducir la eficiencia de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable durante una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

6. Conjugado:

La solución de trabajo se prepara diluyendo el reactivo concentrado 20X con el Diluyente de Conjugado.

Mezclar cuidadosamente con el vórtex antes de usar.

Evitar la contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables únicamente.

Nota importante: La solución de trabajo no es estable. Preparar solamente el volumen necesario para el trabajo del día. Como un ejemplo cuando el equipo se utiliza en combinación con otros instrumentos o manualmente, diluir 0.1 ml de Conjugado 20X con 1.9 ml de Diluyente de Conjugado en un vial de plástico desechable y mezclar cuidadosamente antes de usar.

7. Cromógeno/ Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien volteando.

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

En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

8. Ácido Sulfúrico:

Listo para el uso. Mezclar bien volteando.

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

Leyenda:

Indicación de peligro, **Frases H**

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, **Frases P**

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios

Doc.:	INS SAG1ULTRA.CE/Esp	Página	5 de 9	Rev.:	5	Fecha:	2019/11
-------	----------------------	--------	--------	-------	---	--------	---------

minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

1. Las **micropipetas** deben estar calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (etanol 70%, lejía 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%.
2. La **incubadora ELISA** debe ser ajustada a 37°C (+/- 1°C de tolerancia) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadores secos o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. En caso de **agitación** durante las incubaciones, el instrumento debe garantizar 350 rpm $\pm$ 150. La amplitud de la agitación es muy importante ya que si es errónea pueden producirse salpicaduras y por lo tanto falsos positivos.
4. El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 μ l/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.
5. Los tiempos de incubación deben tener un margen de $\pm$ 5%.
6. El **lector de microplacas** debe estar provisto de un filtro de lectura de 450 nm y, de un segundo filtro de 620-630 nm, obligatorio para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda $\leq$ 10nm b) Rango de absorbancia de 0 a $\geq$ 2.0, c) Linealidad $\geq$ 2.0, reproducibilidad $\geq$ 1%. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente debe procederse al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
7. En caso de usar **sistemas automatizados ELISA**, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación, procesamiento de datos, etc.) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado comprobando la plena coincidencia de los rendimientos declarados del equipo. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente, prestando particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación de muestras y de lavado. Debe estudiarse y controlarse el efecto de arrastre a fin de minimizar la posibilidad de contaminación de

pocillos adyacentes debido a muestras muy reactivas, lo que provocaría resultados falsos positivos. Se recomienda el uso de sistemas automatizados de Elisa para el cribado en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por serie.

8. Cuando se utilizan instrumentos automáticos, en el caso en que los contenedores para viales del instrumento no se ajusten a los viales del equipo, debe transferirse la solución a contenedores adecuados y marcarlos con la misma etiqueta despegada del vial original. Esta operación es importante para evitar la falta de coincidencia de los contenidos de los viales al transferirlos. Cuando la prueba termine, guardar los contenedores secundarios etiquetados a 2-8°C, firmemente cerrados.
9. El **servicio de atención al cliente en Dia.Pro**, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos esenciales del ensayo. También se ofrece apoyo para la instalación de nuevos instrumentos a usar en combinación con el equipo.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa de la caja del equipo. No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los componentes líquidos no están contaminados con partículas ni agregados observables a simple vista. Comprobar que el cromógeno/substrato es incoloro o azul pálido. Comprobar que no se han producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
3. Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
4. Diluir el conjugado concentrado 20X con su diluyente, tal y como se describe.
5. Disolver el calibrador como se ha descrito anteriormente.
6. Dejar los componentes restantes hasta alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego según se describe.
7. Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y alimentar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
8. Comprobar que el lector ELISA ha sido encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
9. Si se utiliza un sistema automatizado, encenderlo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
10. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
11. Asegurarse de que el resto de equipamiento esté disponible y listo para el uso.
12. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

Ensayo automatizado:

En caso de que el ensayo se realice automáticamente con un sistema ELISA, se recomienda que el instrumento dispense primero 150 μ l de controles y calibrador, después todas las muestras y finalmente 100 μ l de conjugado diluido.

Para el paso de pre-lavado (primer punto del procedimiento del ensayo) y para las operaciones siguientes, consulte las instrucciones que aparecen debajo para el Ensayo Manual.

Es muy importante comprobar que el tiempo entre el dispensado de la primera y la última muestra sea calculado por el instrumento y considerado para los lavados.

Ensayo manual:

1. Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico y hacer un ciclo de lavado para hidratar los pocillos. Identificar cuidadosamente los pocillos de controles, calibradores y muestras.

Nota importante: El prelavado (1 ciclo: dispensación de 350 µl de solución de lavado por pocillo además de aspiración) es fundamental para obtener resultados confiables y específicos tanto en el procedimiento automático como en el manual. ¡No omitir!

2. Dejar el pocillo A1 vacío para el blanco.
3. Dispensar 150 µl del Control Negativo, por triplicado, 150 µl de Calibrador por duplicado y 150 µl del Control Positivo. Posteriormente, añadir 150 µl de cada muestra.
4. Comprobar la presencia de las muestras en los pocillos a simple vista (existe una marcada diferencia de color entre los llenos y los vacíos) o por lectura a 450/620nm. (la densidad óptica de las muestras es superior a 0.100).
5. Dispensar 100 µl del Conjugado diluido en todos los pocillos, excepto en el A1 que se utiliza para operaciones de blanco.

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

6. Después de la adición del conjugado comprobar que las muestras han cambiado de color amarillo a rosa/rojo y después incubar la microplaca por **120 min a +37°C**.

Notas importantes:

- c. Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado sólo cuando se hace el ensayo manualmente. No sellar cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.
 - d. Si el proceso es efectuado agitando, asegúrese de tener las mismas rpm de la sección I.3. De lo contrario se podría verificar contaminación dentro el pocillo.
7. Tras la primera incubación, lavar los pocillos como se ha descrito previamente (sección I.4).
 8. Dispensar 200 µl de cromógeno/substrato en todos los pocillos, incluido el A1.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se puede generar un fondo excesivo.

9. Incubar la microplaca protegida de la luz a **18-24°C durante 30 minutos**. Los pocillos con control positivo, calibrador y muestras positivas deben pasar de un tono claro a azul.
10. Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática usando la misma secuencia que en el paso 8. La adición de la solución de ácido cambiará el color del control positivo, el calibrador y las muestras positivas de azul a amarillo/ marrón.
11. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección I.6, con un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

Notas generales importantes:

1. Asegurarse de que no hay impresiones digitales ni polvo en el fondo externo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debería hacerse inmediatamente después de añadir la solución de ácido y, en cualquier caso, nunca transcurridos más de 20 minutos de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.
3. Cuando las muestras que se van a analizar no sean seguramente limpias o hayan estado congeladas, se recomienda seguir el procedimiento abajo descrito en cuanto es menos susceptible a la interferencia de la hemólisis, hiperlipemia, contaminación bacteriana y micropartículas de fibrina. El ensayo se realiza en dos pasos a +37°C con agitación a 350 rpm +150 como sigue:
 - a. dispensar 100 µl de controles, calibradores y muestras
 - b. incubar 60 min a +37°C con agitación
 - c. lavar según las instrucciones (sección I.4)
 - d. dispensar 100 µl de trazador enzimático diluido
 - e. incubar 30 min a +37°C con agitación
 - f. lavar
 - g. dispensar 100 µl de mezcla TMB y H₂O₂
 - h. incubar 30 min a t.amb. con agitación
 - i. parar y leer
 En este procedimiento se puede omitir el prelavado. Este método muestra un rendimiento similar al método estándar por lo cual puede ser utilizado como alternativa.
4. El calibrador (CAL) no afecta al cálculo del valor de corte y, por lo tanto, no afecta al cálculo de los resultados de la prueba. El calibrador (CAL) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO.

Operaciones	Procedimiento
Paso de pre-lavado	ciclo nº 1
Controles&Calibradores&muestras	150 µl
Conjugado diluido	100 µl
1ª incubación	120 min
Temperatura	+37°C
Pasos de lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Cromógeno/substrato	200ul
2ª incubación	30 min
Temperatura	temperatura ambiente
Ácido Sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450nm/620-630nm

En la sección siguiente se describe un ejemplo del esquema de dispensado:

Microplaca

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

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

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza una comprobación en los controles/calibrador cada vez que se usa el equipo para verificar si los valores DO450nm / 620-630 nm o M/Co son los esperados en el análisis.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes resultados:

Parámetro	Exigencia
Pocillo blanco	valor < 0.100 DO450nm
Control negativo (CN)	Valor medio < 0.050 de DO450nm después de leer el blanco
Calibrador 0.5 IU/ml	M/Co > 2
Control Positivo	valor > 1.000 DO450nm

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

En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe:

Problema	Compruebe que
Pocillo blanco > 0.100 DO450nm	1. la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
Control negativo (CN) > 0.050 DO450nm después de leer el blanco	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido alimentado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del control negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
Calibrador M/Co < 2	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en su distribución (por ejemplo, dispensar control negativo en lugar de calibrador) 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
Control Positivo < 1.000 DO450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control negativo en lugar del positivo. En este caso, el control negativo tendrá un valor de DO450nm > 0.050). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si ocurre alguno de los problemas anteriores, después de comprobar, informe al responsable para tomar las medidas pertinentes.

Nota importante:

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

P. CÁLCULO DEL VALOR DE CORTE.

Los resultados de las pruebas se calculan a partir de un valor de corte determinado con la fórmula siguiente sobre el valor medio de DO450nm/620-630nm del control negativo (CN):

$$\text{CN} + 0.050 = \text{Valor de corte (Co)}$$

El valor encontrado en la prueba es utilizado para la interpretación de los resultados, según se describe a continuación.

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

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

La interpretación de los resultados se realiza mediante la relación entre el valor de DO450nm/620-630nm de la muestra (M) y el valor de corte (Co), matemáticamente M/Co. Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

M/Co	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9 – 1.1	Equívoco
> 1.1	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no está infectado por HBV y la unidad de sangre se puede transfundir. Cualquier paciente, cuya muestra resulte equívoca debe someterse a una nueva prueba con una segunda muestra de sangre recogida 1 o 2 semanas después de la inicial. En este caso la unidad de la sangre no debe ser transfundida. Un resultado positivo es indicativo de infección por HBV y por consiguiente el paciente debe ser tratado adecuadamente o la unidad de sangre debe ser descartada.

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Cualquier resultado positivo debe confirmarse antes repitiendo el ensayo sobre la muestra, después de haberla filtrado en un filtro de 0.2-0.8 μ para eliminar la interferencia de las micropartículas. Después, si todavía es positivo, la muestra debe someterse a una prueba de confirmación antes de emitir un diagnóstico de hepatitis viral.
3. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otro departamento, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
4. El diagnóstico de infección con un virus de la hepatitis debe ser realizado y comunicado al paciente por un médico cualificado.

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

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

Control negativo: 0.012 – 0.008 – 0.010 DO450nm
Valor medio: 0.010 DO450nm
Menor de 0.050 – Válido

Doc.:	INS SAG1ULTRA.CE/Esp	Página	8 de 9	Rev.:	5	Fecha:	2019/11
-------	----------------------	--------	--------	-------	---	--------	---------

Control positivo: 2.489 DO450nm

Mayor de 1.000 – Válido

Valor de corte = $0.010 + 0.050 = 0.060$

Calibrador: 0.350 - 0.370 DO 450nm

Valor medio: 0.360 DO450nm M/Co = 6.0

M/Co Mayor de 2.0 – Válido

Muestra 1: 0.028 DO450nm

Muestra 2: 1.690 DO 450nm

Muestra 1 M/Co < 0.9 = negativa

Muestra 2 M/Co > 1.1 = positiva

185	Ayw2	0.5 – 1.0	6,4
186	Ayw3	0.5 – 1.0	7,3
187	Ayw3	0.5 – 1.0	5,8
188	Ayw4	0.5 – 1.0	6,9
189	Ayr	0.5 – 1.0	6,1
190	diluyente	/	0,6

El panel n.º 808, suministrado por Boston Biomedical Inc., Estados Unidos, también se probó para definir el límite de sensibilidad.

Los resultados en condiciones óptimas son los siguientes:

BBI panel PHA 808

ID muestra	Características	ng/ml	M/Co
01	ad	2,49	10,2
02	ad	1,17	4,8
03	ad	1,02	4,3
04	ad	0,96	3,8
05	ad	0,69	2,9
06	ad	0,50	2,2
07	ad	0,41	1,5
08	ad	0,37	1,3
09	ad	0,30	1,2
10	ad	0,23	1,0
11	ay	2,51	11,2
12	ay	1,26	5,9
13	ay	0,97	4,1
14	ay	0,77	3,7
15	ay	0,63	2,0
16	ay	0,48	2,4
17	ay	0,42	2,0
18	ay	0,33	1,8
19	ay	0,23	1,6
20	ay	0,13	1,1
21	negativo	/	0,6

R. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO.

La evaluación del rendimiento ha sido realizada según lo establecido en las Especificaciones Técnicas Comunes (ETC) (Art. 5, Capítulo 3 de la Directiva IVD 98/79/CE). La versión ULTRA ha demostrado ser al menos equivalente al diseño original en un estudio realizado para la validación de la nueva versión.

1. Sensibilidad analítica

El límite de detección del ensayo se ha calculado sobre el 2º estándar internacional O.M.S., NIBSC código 00/588.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de tres lotes (P1, P2 y P3) de la versión ULTRA en comparación con el dispositivo de referencia (Ref.):

O.M.S. IU/ml	Lote P1 M/Co	Lote P2 M/Co	Lote P3 M/Co	Ref. M/Co
0.4	4,6	4,8	4,6	4,6
0.2	2,3	2,4	2,4	2,4
0.1	1,4	1,4	1,5	1,2
0.05	0,8	0,8	1,0	0,7
0.025	0,6	0,6	0,6	0,4
SFB (CN)	0,3	0,2	0,3	0,1

El ensayo mostró una sensibilidad analítica mejor a 0.1 O.M.S. IU/ml de HBsAg.

Además se probaron dos paneles de sensibilidad suministrados por EFS, Francia, y por SFTS, Francia, y se obtuvieron los siguientes resultados en condiciones óptimas:

Panel EFS Ag HBs HB1-HB6 lote n° 04

ID muestra	Características	ng/ml	M/Co
HB1	diluyente	/	0,2
HB2	adw2+ayw3	0.05	0,6
HB3	adw2+ayw3	0.1	1,0
HB4	adw2+ayw3	0.2	1,8
HB5	adw2+ayw3	0.3	2,4
HB6	adw2+ayw3	0.5	4,2

Panel de sensibilidad SFTS, Francia, Ag HBs 2005

ID muestra	Características	ng/ml	M/Co
171	Adw2 + ayw3	2.21 ± 0.15	15,4
172	Adw2 + ayw3	1.18 ± 0.10	8,7
173	Adw2 + ayw3	1.02 ± 0.05	6,1
174	Adw2 + ayw3	0.64 ± 0.04	4,0
175	Adw2 + ayw3	0.49 ± 0.03	3,4
176	Adw2 + ayw3	0.39 ± 0.02	2,6
177	Adw2 + ayw3	0.25 ± 0.02	2,0
178	Adw2 + ayw3	0.11 ± 0.02	1,3
179	Adw2 + ayw3	0.06 ± 0.01	0,9
180	Adw2 + ayw3	0.03 ± 0.01	0,8
181	Adw2	0.5 – 1.0	4,7
182	Adw4	0.5 – 1.0	3,6
183	Adr	0.5 – 1.0	4,5
184	Ayw1	0.5 – 1.0	5,1

2. Sensibilidad Diagnóstica:

La sensibilidad diagnóstica ha sido probada según lo establecido en las Especificaciones Técnicas Comunes (ETC) de la Directiva 98/79/CE en IVD para pruebas HBsAg.

Las muestras positivas, incluidos los subtipos de HBsAg y un panel de mutantes “s” de las mutaciones más frecuentes, se recogieron de distintas patologías de HBV (hepatitis B aguda, asintomática y crónica) o producidas sintéticamente, y se detectaron positivas en el ensayo.

Todos los subtipos conocidos de HBsAg, “ay” y “ad”, y los isoformas “w” y “r”, suministrados por CNTS, Francia, se probaron en el ensayo y el equipo los determinó positivos según lo previsto.

Se ha hallado un valor global de 100% en un estudio realizado sobre un número total de más de 400 muestras positivas con la referencia original IVD código SAG1.CE, marca CE.

Se estudiaron 30 sero-conversiones en total, la mayoría producidas por Boston Biomedica Inc., EE.UU.

Los resultados obtenidos al examinar ocho paneles suministrados por Boston Biomedica Inc., EE.UU., se indican abajo para la versión ULTRA en comparación con el dispositivo de referencia código SAG1.CE.

Panel ID	1ª muestra positiva	HBsAg subtipo	HBsAg ng/ml	Versión ULTRA M/Co	Ref. dispositivo M/Co
PHM 906	02	ad	0.5	3,7	1,4
PHM 907 (M)	06	ay	1.0	4,4	2,9
PHM 909	04	ad	0.3	1,2	0,8
PHM 914	04	ad	0.5	1,1	1,1
PHM 918	02	ad	0.1	1,8	0,5
PHM 923	03	ay	< 0.2	2,2	1,2
PHM 925	03	Ind.	n.d.	1,4	0,9
PHM 934	01	ad	n.d.	1,0	0,8

3. Especificidad Diagnóstica:

Se define como la probabilidad del ensayo de detectar negativos en ausencia del analito específico. Además del primer estudio, donde se examinaron más de 5000 muestras negativas de donantes de sangre (dos centros de donación) clasificadas como negativas con un dispositivo con marca CE en uso en el laboratorio de recogida, la especificidad diagnóstica se evaluó recientemente examinando un total de 2288 muestras de donantes de sangre negativas en siete lotes distintos. Se observó un valor de especificidad de 100%.

Se emplearon además plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrato, EDTA y heparina) y suero humanos para determinar la especificidad.

No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

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

Se examinaron muestras procedentes de pacientes afectados por hepatitis víricas (HCV, HVA) y patologías no víricas del hígado, que pudieran provocar interferencia en el ensayo. No se detectó reacción cruzada.

4. Precisión:

Ha sido calculada para la versión ULTRA en dos muestras examinadas en 16 réplicas en 3 series diferentes para tres lotes.

Los resultados se indican en la siguiente tabla:

Valores promedio Total n = 144	Negativo Muestra	Calibrador 0.5 IU/ml
DO450nm	0.026	0.332
Desviación estándar	0.004	0.027
CV %	16%	8%

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

S. LIMITACIONES.

Se evaluaron resultados falso positivo repetibles en muestras recién recogidas en menos del 0.1% de la población normal, debido principalmente a altos títulos de anticuerpo anti ratón heterofílicos (HAMA).

También se observaron interferencias en muestras frescas cuando no estaban libres de partículas o se recogieron incorrectamente (ver capítulo G).

Las muestras antiguas o congeladas, con coágulos de fibrina, crioglobulinas, micelas que contienen lípidos o micropartículas después de almacenar o descongelar, pueden generar falsos positivos.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Aach R.D., Grisham J.W., Parker S.W.. Detection of Australia antigen by radioimmunoassay. Proc.Natl.Acad.Sci..USA, 68:1956, 1971.
2. Blumer B.S., Suinick A.I., London W.T.. Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen. Bull.N.Y.Acad.Med.. 44:1566, 1968.
3. Boniolo A., DAVIS M., Matteja R.. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for screening hybridoma antibodies against hepatitis B surface antigen. J.Immunol.Meth.. 49:1, 1982.
4. Caldwell C.W., Barpet J.T.. Enzyme immunoassay for hepatitis B and its comparison to other methods. Clin.Chim.Acta 81: 305, 1977
5. Fazekas S., De St.Groth, Scheidegger D.. production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J.Immunol.Meth.. 35: 1, 1980
6. Reesink H.W.. et al.. Comparison of six 3rd generation tests for the detection of HBsAg. Vox.Sang.. 39:61, 1980
7. Rook G.A.W.. Chromogens for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using horseradish peroxidase. Lepr.Rev. 52: 281, 1981
8. Schroder J.. Monoclonal antibodies: a new tool for research and immunodiagnostic. Med.Biol.. 58: 281, 1981
9. Coleman PF, Chen YC, Mushahwar IK. Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants. J.Med.Virol. 1999;59(1):19-24

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el mercado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:

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

CE
0318

HDV IgM

**“Capture” Enzyme ImmunoAssay
(ELISA) for the determination of IgM
antibodies to Hepatitis Delta Virus
in human plasma and sera**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

HDV IgM

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the determination of IgM class antibodies to Hepatitis Delta Virus or HDV in human plasma and sera with the "capture" system. The kit is intended for the classification of the viral infective agent and the follow-up of HDV infected patients.

For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

The Hepatitis Delta Virus or HDV is a RNA defective virus composed of a core presenting the delta-specific antigen, encapsulated by HBsAg, that requires the helper function of HBV to support its replication.

Infection by HDV occurs in the presence of acute or chronic HBV infection. When acute delta and acute HBV simultaneously occur, the illness becomes severe and clinical and biochemical features may be indistinguishable from those of HBV infection alone. In contrast, a patient with chronic HBV infection can support HDV replication indefinitely, usually with a less severe illness appearing as a clinical exacerbation.

The determination of HDV specific serological markers (HDV Ag, HDV IgM and HDV IgG) represents in these cases an important tool to the clinician for the classification of the etiological agent, for the follow up of infected patients and their treatment.

The detection of HDV IgM and IgG antibodies allows the classification of the illness and the monitoring of the seroconversion event.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with a monoclonal anti-hIgM antibody that in the 1st incubation "captures" specifically this class of antibodies.

After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti HDV IgM are detected by the addition of recombinant HDV antigen immunocomplexed with a specific antibody, labeled with peroxidase (HRP).

After washing, the enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of IgM antibodies present in the sample.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to carry out 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips of 8 breakwells coated with purified anti human IgM specific mouse monoclonal antibody and sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

2. Negative Control: CONTROL -

1x2.0 ml/vial. Ready to use. It contains, human antibodies negative to HDV, 3% skimmed milk, 0.2M Tris buffer pH 6.0+/-0.1, 0.2% Tween 20, 0.09% Na azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

The Negative Control is pale yellow color coded.

3. Positive Control: CONTROL +

1x2.0 ml/vial. Ready to use. It contains, human IgM antibodies positive to HDV, 3% skimmed milk, 0.2M Tris buffer pH 6.0+/-0.1, 0.2% Tween 20, 0.09% Na azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

The Positive Control is green yellow color coded.

Important Note: Even if this material has been chemically inactivated, handle as potentially infectious.

4. Calibrator: CAL ...

n° 1 vial. Lyophilized reagent to be dissolved with EIA grade water as reported in the label. It contains fetal bovine serum, human IgM antibodies to HDV, 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

Important Notes:

1. The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label .

2. Even if this material has been chemically inactivated, handle as potentially infectious.

5. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle. 20x concentrated solution.

Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

6. Enzyme Conjugate 20X: CONJ 20X

1x0.8 ml/vial. 20X concentrated solution. It contains peroxidase labeled polyclonal antibody to HDV. The reagent is dissolved into a buffer solution 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 5% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives.

7. HDV Antigen: Ag HDV

1x6 vials. Lyophilized reagent to be dissolved with 1.9 ml proper diluent. It contains non infective recombinant HDV Antigen, 25 mM Tris buffer pH 7.8+/-0.1 and 5% human serum proteins.

8. HDV Antigen Diluent: Ag DIL

1x16 ml/vial. Buffered solution for the dissolution of the lyophilized HDV antigen. It contains 0.2 M Tris buffer pH 6.0+/-0.1, 0.045% ProClin 300 and 0.2% Triton X100. The component is red colour coded.

9. Specimen Diluent: DILSPE

2x60.0 ml/vial. Buffered solution for the dilution of samples; it contains 0.2M Tris buffer pH 6.0+/-0.1, 0.2% Tween 20, 3% Skimmed milk, 0.045% ProClin 300 and 0.09% sodium azide as preservatives. The component is blue clour coded.

10. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

1x16ml/vial. Contains a 50 mM citrate-phosphate buffered solution at pH 3.5-3.8, 0.03% tetra-methyl-benzidine or TMB, 4% dimethylsulphoxide and 0.02% hydrogen peroxide of H₂O₂.

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

11. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vial. Contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

12. Plate sealing foils n° 2

13. Package insert n° 1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen/Substrate (TMB/H₂O₂) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
5. Upon receipt, store the kit at +2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures.
8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
10. Do not use the kit after the expiration date stated on external (primary container) and internal (vials) labels.
11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. The use of disposable plastic labware is recommended in the preparation of the washing solution or in transferring components into other containers of automated workstations, in order to avoid contamination.
13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..
14. Accidental spills have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water.
16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND RECOMMENDATIONS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate.
3. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
4. Haemolysed (red) and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.
5. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
6. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8µ filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-uses of the device and up to 3 months.

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant has not turned dark green, indicating a defect in manufacturing.

In this case, call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back into the aluminum pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°-8°C. When opened the first time, unused strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

Negative and Positive Controls:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Calibrator:

Lyophilized reagent to be dissolved with EIA grade water as reported in the label.

Note: The dissolved calibrator is not stable. Store it frozen in aliquots at -20°C.

Wash buffer concentrate:

The whole content of the 20x concentrated solution has to be diluted with bidistilled water up to 1200 ml and mixed gently end-over-end before use.

During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8°C.

Immunocomplex:

Dissolve the lyophilized HDV Antigen with 1.9 ml HDV Antigen Diluent and mix gently in order to dissolve completely the content of the vial.

When all the powder is dissolved, add 100 µl 20X concentrated Enzyme Conjugate and mix gently on vortex.

Important Notes:

1. The preparation of the Immunocomplex has to be carried out just after the dispensation of controls&calibrator and samples into the microplate.
2. The so prepared immunocomplex is not stable when liquid. Freeze what not used in aliquots at -20°C. Thaw only once and do not use this frozen material after the expiration date of the kit.

Specimen Diluent

Ready to use. Mix on vortex before use.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. Do not expose to strong light, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, and if possible, sterile disposable container.

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (70% ethanol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample or the components of the kit. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of $\pm 2\%$.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of $\pm 0.5^\circ\text{C}$) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution.

The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).

5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.

An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.

4. Incubation times have a tolerance of $\pm 5\%$.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth $\leq 10\text{ nm}$; (b) absorbance range from 0 to 4; (c) linearity to 4; repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, shaking, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing samples and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells due to strongly reactive samples, leading to false positive results. The use of ELISA automated work stations is recommended for blood screening and when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure full compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates. Check that the Chromogen/Substrate is colorless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
4. Dissolve the Calibrator as described above and gently mix.
5. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
6. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
7. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
8. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
9. Check that the micropipettes are set to the required volume.
10. Check that all the other equipment is available and ready to use.

11. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

The assay has to be performed according to the procedure given below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples being tested.

- Place the required number of strips in the plastic holder and carefully identify the wells for standards and samples.
- Dilute samples 1:200 dispensing 1 ml Specimen Diluent into a disposable tube and then 5 µl sample; mix on vortex before use. Do not dilute controls & calibrator as they are ready-to-use.
- Leave the A1 well empty for blanking purposes.
- Pipette 100 µl of the Negative Control in triplicate, 100 µl of the Calibrator in duplicate and 100 µl of the Positive Control in single.
- Then pipette 100 µl of diluted samples in the proper wells.
- Finally incubate the microplate **for 60 min at +37°C**.

Important notes:

- Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, only when the test is performed manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.*
 - Prepare the Immunocomplex as described.*
- When the first incubation is finished, wash the microwells as previously described (section I.3)
 - In all the wells except A1, pipette 100 µl Immunocomplex and incubate the microplate **for 60 min at +37°C**.

Important note: Be careful not to touch the inner surface of the well with the pipette tip. Contamination might occur.

- When the second incubation is over, wash the microwells as previously described (section I.3)
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate into all the wells, A1 included.

Important note: Do not expose to strong direct light. as a high background might be generated.

- Incubate the microplate protected from light at **room temperature (18-24°C) for 20 min.** Wells dispensed with positive samples, the Positive Control and the Calibrator as well will turn from clear to blue.
- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells to stop the enzymatic reaction, using the same pipetting sequence as in step 10. Addition of the stop solution will turn the Positive Control, the Calibrator and positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5 using a 450nm filter (reading) and a 620-630nm filter (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

Important notes:

- Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.*
- Reading has should ideally be performed immediately after the addition of the Stop Solution but definitely no longer than 20 minutes afterwards. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to a higher background.*
- The Calibrator (CAL) does not affect the cut-off calculation and therefore the test results calculation. The Calibrator may be used only when a laboratory internal quality control is required by the management.*

N. ASSAY SCHEME

Controls & Calibrator	100 µl
Diluted samples (1:200)	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Washing steps	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Immunocomplex	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Washing steps	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Chromogen/Substrate	100µl
2nd incubation	20 min
Temperature	room
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm / 620-630nm

An example of dispensation scheme is reported in the table below:

Microplate

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

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

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A check is performed on the controls/calibrator any time the kit is used in order to verify whether the expected OD450nm or S/Co values have been matched in the analysis.

Ensure that the following parameters are met:

Parameter	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm
Negative Control	< 0.200 OD450nm after blanking
Coefficient of variation	< 30%
Calibrator	S/Co > 2.5
Positive Control	> 0.900 OD450nm

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.
If they do not, do not proceed any further and perform the following checks:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not become contaminated during the assay
Negative Control > 0.200 OD450nm after blanking	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study;
coefficient of variation > 30%	2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use;
	3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of negative control);
	4. that no contamination of the Negative Control, or of the wells where this was dispensed, has

	occurred due to positive samples, to spills or to the enzyme conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
Calibrator S/Co < 2.5	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution; 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the standard has occurred.
Positive Control < 0.900 OD450nm	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during the distribution of the control; 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

If any of the above problems have occurred, report the problem to the supervisor for further actions.

Important note:

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 13.

P. CALCULATION OF DATA

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

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

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

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as a ratio of the sample OD450nm /620-630nm and the cut-off value (or S/Co) according to the following table:

S/Co	Interpretation
< 0.9	Negative
0.9 – 1.1	Equivocal
> 1.1	Positive

A negative result indicates that the patient is not infected by HDV (acute phase).

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

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

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgement errors and misinterpretations.
2. Any positive sample should be submitted to the Confirmation Test reported in section T before giving a result of positivity. By carrying out this test, false reactions,

leading to a misinterpretation of the analytical result, can be revealed and then ruled out.

3. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
4. Diagnosis of viral hepatitis infection has to be taken and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 13).

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

Negative Control: 0.100 – 0.120 – 0.080 OD450nm
Mean Value: 0.100 OD450nm
Lower than 0.200 – Accepted

Positive Control: 2.000 OD450nm
Higher than 0.900 – Accepted

$$\text{Cut-Off} = 0.100 + 0.250 = 0.350$$

Calibrator: 1.000 – 1.100 OD450nm
Mean value: 1.050 OD450nm S/Co = 3.0
S/Co higher than 2.5 – Accepted
Sample 1: 0.080 OD450nm
Sample 2: 1.800 OD450nm
Sample 1 S/Co < 0.9 = negative
Sample 2 S/Co > 1.1 = positive

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what reported in the Common Technical Specifications or CTS (art. 5, Chapter 3 of IVD Directive 98/79/EC).

1. Limit of detection

No international standard for HDV IgM Antibody detection has been defined by CTS.

In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient in the acute phase of the infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

The limit of detection of the assay has been therefore calculated on three lots by comparison with a commercial European kit.

A limiting dilution curve was prepared in negative plasma.

Results of Quality Control are given in the following table:

Internal Gold Standard (IGS)

IGS	Lot #	1102	Lot #	0103	Lot #	0403	DiaSorin
dilution	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co	S/Co
1 X	0.728	2.5	0.783	2.6	0.837	2.7	2.6
2 X	0.443	1.5	0.461	1.5	0.471	1.5	1.4
4 X	0.286	1.0	0.281	0.9	0.305	1.0	1.0
8 X	0.154	0.5	0.160	0.5	0.185	0.6	0.5
Plasma -	0.039	0.1	0.054	0.2	0.065	0.2	0.2

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The diagnostic performances were evaluated in a performance evaluation conducted by the Department of Gastro-Hepatology, Prof. M.Rizzetto, S.Giovanni Battista hospital, Torino, Italy, on more than 400 samples against a reference European kit.

Positive samples were collected from patients undergoing acute HDV infection.

The diagnostic specificity has been determined on panels of more than 250 negative samples from normal individuals and blood donors, classified negative with the reference kit.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been

used to determine the specificity. No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed. Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

Samples derived from patients with different viral (HCV, HAV) and non viral pathologies of the liver that may interfere with the test were examined. No cross reaction were observed.

The Performance Evaluation study conducted in a qualified external reference center on more than 400 samples has provided the following values :

Sensitivity	> 98 %
Specificity	> 98 %

3. Reproducibility:

It has been calculated on three samples examined in replicates in different runs. The mean values obtained from a study conducted on three samples of different HDV IgM reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs is reported below:

DIM.CE: lot # 1102

Negative Control (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.061	0.056	0.056	0.058
Std.Deviation	0.008	0.007	0.007	0.008
CV %	13.9	13.0	12.9	13.3

Calibrator (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.798	0.810	0.802	0.803
Std.Deviation	0.044	0.041	0.046	0.044
CV %	5.5	5.1	5.7	5.4
S/Co	2.6	2.6	2.6	2.6

Positive Control (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.133	2.143	2.134	2.137
Std.Deviation	0.081	0.081	0.095	0.086
CV %	3.8	3.8	4.4	4.0
S/Co	6.9	7.0	7.0	7.0

DIM.CE: lot # 0103

Negative Control (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.062	0.059	0.066	0.062
Std.Deviation	0.008	0.005	0.006	0.006
CV %	12.4	9.3	9.2	10.3

Calibrator (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.843	0.843	0.826	0.837
Std.Deviation	0.051	0.051	0.045	0.049
CV %	6.0	6.0	5.4	5.8
S/Co	2.7	2.7	2.7	2.7

Positive Control (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.299	2.278	2.227	2.268
Std.Deviation	0.115	0.102	0.112	0.110
CV %	5.0	4.5	5.0	4.8
S/Co	7.4	7.4	7.0	7.3

DIM.CE: lot # 0403

Negative Control (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.066	0.070	0.067	0.068
Std.Deviation	0.006	0.008	0.008	0.007
CV %	9.8	10.7	11.3	10.6

Calibrator (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.800	0.813	0.815	0.809
Std.Deviation	0.044	0.046	0.049	0.046
CV %	5.5	5.7	6.0	5.7
S/Co	2.5	2.5	2.6	2.5

Positive Control (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.352	2.328	2.339	2.340
Std.Deviation	0.093	0.098	0.105	0.099
CV %	3.9	4.2	4.5	4.2
S/Co	7.5	7.3	7.4	7.4

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

Important note:

The performance data have been obtained proceeding as the reading step described in the section M, point 13.

S. LIMITATIONS

False positivity has been assessed as less than 2 % of the normal population, mostly due to high titers of Rheumatoid Factor.

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

T. CONFIRMATION TEST

The confirmation test has to be carried out on any positive sample before a diagnosis of primary infection of HDV is released to the doctor.

Proceed for confirmation as follows:

1. Prepare the Antigen/Conjugate Complex as described in the proper section. This reagent is called Solution A.
2. Then 25 µl concentrated Enzymatic Conjugate are diluted in 500 µl Antigen Diluent and mixed gently on vortex. Do not use any lyophilized vial of HDV Antigen for this procedure ! This solution is called Solution B.
3. The well A1 of the strip is left empty for blanking.
4. The Negative Control is dispensed in the strip in positions B1+C1. This is used for the calculation of the cut-off and S/Co values.
5. The positive sample to be confirmed, diluted 1:201, is dispensed in the strip in position D1+E1.
6. The strip is incubated for 60 min at +37°C.
7. After washing, the blank well A1 is left empty.
8. 100 µl of Solution A are dispensed in wells B1+C1+D1.
9. Then 100 µl of Solution B are added to well E1.

10. The strip is incubated for 60 min at +37°C.
11. After washing, 100 µl Chromogen/Substrate are added to all the wells and the strip is incubated for 20 min at r.t.
12. 100 µl Sulphuric Acid are added to all the wells and then their color intensity is measured at 450nm (reading filter) and at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1.

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Interpretation of results is carried out as follows:

1. If the sample in position D1 shows a S/Co value lower than 0.9 a problem of dispensation or contamination in the first test is likely to be occurred. The Assay Procedure in Section M has to be repeated to double check the analysis.
2. If the sample in position D1 shows a S/Co value higher than 1.1 and in position E1 shows a S/Co value still higher than 1.1 the sample is considered a **false positive**. The reactivity of the sample is in fact not dependent on the specific presence of HDV Antigen and a crossreaction with the polyclonal antibody, labeled with HRP, has occurred.
3. If the sample in position D1 shows a S/Co value higher than 1.1 and in position E1 shows a S/Co value lower than 0.9 the sample is considered a **true positive**. The reactivity of the sample is in fact dependent on the specific presence of HDV Antigen and not due to any crossreaction.

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

CE
0318

The following table is reported for the interpretation of results:

Well	S/Co		
D1	< 0.9	> 1.1	> 1.1
E1	< 0.9	> 1.1	< 0.9
Interpretation	Problem of contamination	False positive	True positive

REFERENCES

1. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunochemistry 8: 871-874, 1971
2. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol.. 109: 129-135, 1971
3. Chaggar K. Et al.. Journal of Virological Methods. 32: 193-199, 1991
4. Lazinski D.W. et al.. Journal of Virol.. 67: 2672-2680, 1993
5. Govindarajan S. et al.. Microbiol. And Immunol.. 95: 140-141, 1990
6. Shattock A.G. et al.. J.Clin.Microbiol.. 29: 1873-1876, 1991
7. Forbes B.A. et al.. Clin.Microbiol.News.. 13: 52-54, 1991
8. Bergmann, K. et al. J.Immunol. 143:3714-3721, 1989
9. Bergmann, K. et al. J.Infect.Dis. 154:702-706, 1986
10. Buti, M. et al. Hepatology 8:1125-1129, 1988
11. Rizzetto, M. Hepatology 3729-737, 1983
12. Rizzetto, M. et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77:6124-6128, 1980
13. Dubois, F. et al. J.Clin.Microbiol. 26:1339-1342, 1988
14. Wang, K. et al. Nature 323:508-514, 1986
15. Grebenchtchikov N. et al.. J.Immunol. Methods, 15(2) :219-231, 2002
16. Schrijver RS and Kramps JA, Rev.Sci.Tech. 17(2):550-561, 1998

HDV IgM

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA)
de “captura” para la determinación
de anticuerpos IgM frente al
virus de la hepatitis Delta
en plasma y suero humanos**

Uso exclusivo para diagnóstico “in vitro”



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF DIM.CE
96 pruebas

IgM HDV

A. OBJETIVO DEL EQUIPO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos de la clase IgM frente al Virus de la Hepatitis Delta (HDV) en plasma y suero humanos, mediante un sistema de captura. El equipo ha sido desarrollado para la clasificación del agente vírico infeccioso y para el seguimiento de pacientes infectados con HDV.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN.

El Virus de la Hepatitis Delta es un virus ARN defectivo. Se compone de un núcleo con los antígenos delta específicos, y está encapsulado por el HBsAg. Para su replicación necesita ayuda funcional de VHB.

La infección por HDV ocurre en presencia de una infección aguda o crónica por VHB. Cuando se presenta simultáneamente la infección aguda por los dos virus, la enfermedad es grave y el cuadro clínico, así como las características bioquímicas, son prácticamente indistinguibles de una infección por VHB sólo. Sin embargo, una persona infectada por VHB de forma crónica puede soportar indefinidamente la replicación del HDV, normalmente la enfermedad es menos grave y aparece como exacerbación clínica.

La determinación de los marcadores serológicos específicos de HDV (Ac HDV, IgM HDV e IgG HDV) representa una herramienta importante para los clínicos en la clasificación del agente etiológico, en el seguimiento de los pacientes y en el tratamiento.

La detección de anticuerpos IgM e IgG frente al HDV permite la clasificación de la enfermedad y la monitorización de la seroconversión.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

Las microplacas están recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-IgM que, durante la primera incubación, captura específicamente esta clase de anticuerpos.

En la segunda incubación, después del lavado, se añade un inmunocomplejo (un antígeno recombinante del HDV y un anticuerpo específico) marcado con peroxidasa (HRP), a fin de detectar los anticuerpos anti-HDV clase IgM unidos a la fase sólida.

Después del lavado, la enzima capturada en la fase sólida se combina con la mezcla cromógeno/substrato, generando una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgM presentes en la muestra.

D. COMPONENTES

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLATE

12 tiras intercambiables de 8 pocillos, recubiertos con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgM humano purificado, en bolsas selladas con desecante. Se deben poner las placas a temperatura ambiente antes de abrirlas, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y almacenar a 4°C.

2. Control negativo: CONTROL

1x2.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene anticuerpos humanos negativos al HDV, 3% de leche descremada, tampón Tris-0.2M a pH 6.0 +/-0.1, 0.2% de Tween 20, además de azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes.

El control negativo está codificado con el color amarillo pálido.

3. Control positivo: CONTROL+

1x2.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene anticuerpos IgM humanos positivos al HDV, 3% de leche descremada, tampón Tris 0.2M a pH 6.0 +/-0.1, 0.2% de Tween 20, además de azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes.

El control positivo está codificado con el color verde-amarillo.

Nota importante: Aun cuando los anticuerpos han sido inactivados químicamente, manipule el material como potencialmente infeccioso.

4. Calibrador: CAL ...

n° 1 vial. Reactivo liofilizado para disolver en agua calidad EIA como se indica en la etiqueta. Contiene suero fetal bovino, anticuerpos humanos clase IgM frente a HDV, además de sulfato de gentamicina 0.2 mg/ml y ProClin 300 0.045% como conservantes.

Notas importantes:

1. El volumen necesario para disolver el contenido del vial, varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen indicado en la etiqueta.

2. Aún cuando los anticuerpos han sido inactivados químicamente, manipule el material como potencialmente infeccioso.

5. Solución de lavado concentrada: WASHBUF 20X

1x60ml/frasco. Solución concentrada 20x.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% de Tween 20 y ProClin 300 0.045%.

6. Conjugado 20X: CONJ 20X

1x0.8 ml/vial. Solución concentrada 20X. Contiene anticuerpo policlonal anti-HDV conjugado con peroxidasa (HPR). El reactivo se disuelve en una solución tampón: tampón Tris 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, 5% de albúmina de suero bovino, ProClin 300 0.045% y 0.02% de sulfato de gentamicina como conservantes..

7. Antígeno HDV: Ag HDV

1x6 viales. Reactivo liofilizado para disolver en 1.9 ml del diluyente adecuado. Contiene antígeno recombinante HDV, no infeccioso, tampón Tris 25 mM a pH 7.8 +/-0.1 y 5% de proteínas del suero humano.

8. Diluyente de antígeno HDV: Ag DIL

1x16 ml/vial. Solución tamponada para la disolución del antígeno HDV liofilizado. Contiene tampón Tris 0.2M a pH 6.0 +/- 0.1, ProClin 300 0.045% y 0.2% de Tritón 100X. El componente está codificado con el color rojo.

9. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60.0 ml/vial. Solución tamponada para la disolución de las muestras. Contiene tampón Tris 0.2M a pH 6.0 +/- 0.1, 3% de leche descremada, 0.2% de Tween 20, azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes. El reactivo está codificado con el color azul.

10. Cromógeno/substrato SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato-fosfato 50 mM a pH 3.5-3.8, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02% así como dimetilsulfóxido 4%.

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

11. Ácido sulfúrico: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0.3M

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

12. Sellador adhesivo n° 2

13. Manual de instrucciones n° 1

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

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

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar los indumentales protectores adecuados de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los equipos, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno/substrato (TMB/H₂O₂) y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar componentes de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos del mismo lote.
7. Comprobar que los reactivos no contengan precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa (envase primario) y en las etiquetas internas (viales).
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infectivas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones cruzadas.
13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos procedentes del

procedimiento de lavado, de restos de controles y muestras deben ser tratados como material potencialmente infeccioso y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con una concentración final de lejía al 10% durante 16 a 18 horas o la inactivación con calor mediante autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Evitar el uso de conservantes, en particular azida sódica, ya que puede afectar la actividad enzimática del conjugado.
3. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Cuando el equipo se emplea para el cribado de unidades de sangre, se recomienda el uso del código de barras y la lectura electrónica.
4. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
5. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses. Evitar congelar/descongelar cada muestra más de una vez, ya que pueden generarse partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
6. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0.2-0.8 micras.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES

En un estudio realizado con un equipo abierto no se ha detectado pérdida de actividad relevante utilizándolo hasta 6 veces y durante un período de hasta 3 meses.

Microplacas:

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

De ser así, llame al servicio de atención al cliente de Dia.Pro. Las tiras no utilizadas deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Cuando se abre por primera vez, las tiras sobrantes se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambia de amarillo a verde.

Controles negativo y positivo:

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

Calibrador:

Reactivo liofilizado para disolver con agua de calidad EIA, según lo indicado en la etiqueta.

Nota: El calibrador disuelto no es estable. Se recomienda almacenar congelado en alícuotas a -20°C .

Solución de lavado concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada hasta 1200 ml y mezclarse suavemente antes de usarse.

Durante la preparación hay que evitar la formación de espuma y burbujas, que podrían reducir la eficiencia de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre $+2$ y 8°C .

Inmunocomplejo:

Disolver el antígeno HDV liofilizado en 1.9 ml de diluyente de antígeno HDV y mezclar suavemente hasta disolver completamente el contenido del vial.

Cuando el polvo se haya disuelto completamente, añadir 100 μl del Conjugado concentrado 20X y mezclar suavemente en un vórtex.

Notas importantes:

1. La preparación de inmunocomplejo debe efectuarse justo después de dispensar en la placa los controles, el calibrador y las muestras.
2. El inmunocomplejo preparado así no es estable en estado líquido. Separar en alícuotas y congelar a -20°C el inmunocomplejo no utilizado. Descongelar una sola vez y no usar este material congelado después de la fecha de caducidad del equipo.

Diluyente de muestras:

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

Cromógeno/substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar la contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Ácido sulfúrico:

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

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

Leyenda:

Indicación de peligro, Frases H

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, Frases P

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO

1. Las micropipetas deben estar calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (etanol 70%, lejía 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de $\pm 2\%$.
2. La incubadora ELISA debe ser ajustada a 37°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ de tolerancia) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. El lavador ELISA es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 μl /pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.
4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de $\pm 5\%$.
5. El lector de microplaca ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro de 620-630 nm, obligatorio para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda $\leq 10\text{nm}$ b) Rango de absorbancia de 0 a 4, c) Linealidad a 4.0, reproducibilidad $\geq 1\%$. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente debe procederse al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
6. En caso de usar un sistema automatizado ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de contaminación de pocillos adyacentes. Se recomienda el uso de sistemas automatizados de Elisa para el cribado en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por serie.
7. El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos. También se ofrece apoyo para la instalación de nuevos instrumentos a usar con el equipo.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa (envase primario). No usar si ha caducado.

- Comprobar que los componentes líquidos no están contaminados con partículas ni agregados visibles. Comprobar que el cromógeno/substrato es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen con una pipeta estéril de plástico. Comprobar que no han ocurrido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Comprobar que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no está perforada ni dañada.
- Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
- Disolver el calibrador como se ha descrito anteriormente y mezclar suavemente.
- Dejar los componentes restantes hasta alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
- Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y alimentar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
- Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
- Si se utiliza un sistema automatizado, encenderlo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
- Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
- Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
- En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación; es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

- Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico e identificar cuidadosamente los pocillos para estándares y muestras.
- Diluir las muestras 1:200 dispensando en un tubo desechable 1 ml de diluyente de muestras y 5 µl de muestra, mezclar con vórtex antes de usar. No es necesario diluir los controles ni el calibrador, ya que están listos para el uso.
- Dejar el pocillo A1 vacío para el blanco.
- Dispensar 100 µl del control negativo, por triplicado, 100 µl de calibrador, por duplicado, y 100 µl del control positivo.
- Posteriormente, añadir 100 µl de muestras diluidas en sus respectivos pocillos.
- Incubar la microplaca **60 min a +37°C**.

Notas importantes:

- Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado sólo cuando se hace el ensayo manualmente. No sellar cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.
- Preparar el inmunocomplejo según se ha descrito.

- Tras la primera incubación, lavar los pocillos como se ha descrito previamente (sección I.3).
- Dispensar 100 µl del inmunocomplejo en todos los pocillos, excepto el A1. Incubar la microplaca **60 min a +37°C**.

Nota importante: Hay que tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta. Podría producirse contaminación.

- Tras la segunda incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
- Dispensar 100 µl de cromógeno/substrato en todos los pocillos, incluido el A1.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se puede generar un fondo excesivo.

- Incubar la microplaca protegida de la luz a **temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos**. Los pocillos con muestras positivas, el control positivo y el calibrador pasarán de un tono claro a azul.
- Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática usando la misma secuencia que en el paso 10. La adición de la solución de parada cambia el color del control positivo, el calibrador y las muestras positivas de azul a amarillo.
- Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450nm (lectura) y otro de 620-630nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

Notas importantes:

- Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
- La lectura debería hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos más de 20 minutos de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.
- El calibrador (CAL) no afecta al cálculo del valor de corte y, por lo tanto, no afecta al cálculo de los resultados de la prueba. El calibrador (CAL) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.
-

N. ESQUEMA DEL ENSAYO

Controles y calibrador	100 µl
Muestras diluidas (1:200)	100 µl
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Pasos de lavado	5 ciclos con 20" de remojo o 6 ciclos sin remojo
Inmunocomplejo	100 µl
2da incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Pasos de lavado	5 ciclos con 20" de remojo o 6 ciclos sin remojo
Cromógeno/substrato	100 µl
3ª incubación	20 min
Temperatura	t.a.*
Ácido sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450 nm / 620-630 nm

*t.a.: temperatura ambiente

En la tabla siguiente se describe un ejemplo del esquema de dispensado:

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

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

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Se realiza una comprobación en los controles/calibrador cada vez que se usa el equipo para verificar si los valores DO450nm/620-630nm o M/Co son los esperados en el análisis. Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Requerimientos
Pocillo blanco	Valor < 0.100 DO450nm
Control negativo (CN)	Valor < 0.200 DO450nm después de leer el blanco
Coeficiente de variación	< 30%
Calibrador	M/Co > 2.5
Control positivo (CP)	> 0.900 DO450nm

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

En caso contrario, no siga adelante y compruebe:

Problema	Comprobar que
Pocillo blanco > 0.100 DO a 450nm	1. la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
Control negativo (CN) > 0.200 DO a 450nm después de leer el blanco	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido alimentado con la misma antes del uso.
Coeficiente de variación > 30%	3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del control negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas, a derrames o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas ni con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
Calibrador M/Co < 2.5	1. el procedimiento ha sido ejecutado correctamente. 2. no se han cometido errores en su distribución. 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del estándar.
Control positivo < 0.900 DO450nm	1. el procedimiento ha sido ejecutado correctamente. 2. no se han cometido errores durante la distribución del control. 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si se ha producido alguno de los problemas anteriores, informe al responsable para tomar las medidas pertinentes.

Nota importante:

El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 13.

P. CÁLCULO DE DATOS

Si la prueba resulta válida, los resultados se calculan a partir del valor medio de DO450nm/620-630nm del Control Negativo (CN) por medio de un Valor de Corte (Co) determinado con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de corte} = \text{CN} + 0.250$$

Nota importante: Cuando el cálculo de los resultados se realiza mediante el sistema operativo de un equipo automatizado de ELISA, es necesario asegurarse de que se utiliza la formulación adecuada para generar la correcta interpretación de los resultados.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación de los resultados se realiza mediante la razón entre la DO a 450 nm / 620-630 nm de las muestras y el valor de corte (M/Co), según se aprecia en la tabla siguiente:

M/Co	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9 – 1.1	Equívoco
> 1.1	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no está infectado por HDV (fase aguda).

Cualquier paciente cuya muestra resulte equívoca debe someterse a una nueva prueba con una segunda muestra de sangre extraída 1 ó 2 semanas después de la inicial.

Un resultado positivo es indicativo de infección en curso por HDV y por consiguiente el paciente debe ser tratado adecuadamente.

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Todas las muestras positivas deben someterse a la prueba de confirmación descrito en la sección T antes de emitir el resultado de positividad. Mediante la realización de dicha prueba pueden detectarse —y descartarse— reacciones falsas, causantes de interpretaciones erróneas del resultado analítico.
3. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
4. El diagnóstico de infección con un virus de la hepatitis debe ser realizado y comunicado al paciente por un médico cualificado.

A continuación se incluye un ejemplo de los cálculos (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 13).

Los siguientes datos no deben usarse en lugar de los valores reales obtenidos por el usuario:

Control negativo: 0.100 – 0.120 – 0.080 DO450nm
 Valor medio: 0.100 DO450nm
 Menor de: 0.200 – Válido

Control positivo: 2.000 DO450nm
 Mayor de 0.900 – Válido

$$\text{Valor de corte} = 0.100 + 0.250 = 0.350$$

Calibrador: 1.000 – 1.100 DO450nm
 Valor medio: 1.050 DO450nm M/Co = 3.0
 M/Co mayor de 2.5 – Válido

Muestra 1: 0.080 DO450nm
 Muestra 2: 1.800 DO450nm
 Muestra 1 M/Co < 0.9 = negativa
 Muestra 2 M/Co > 1.1 = positiva

R. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

La evaluación del rendimiento ha sido realizada según lo establecido en las Especificaciones Técnicas Comunes (ETC) (Art. 5, Capítulo 3 de la Directiva IVD 98/79/CE).

1. Límite de detección.

Ningún estándar internacional para la detección de anticuerpos IgM anti-HDV ha sido definido en las ETC.

Con el objetivo de garantizar una excelente y constante sensibilidad del dispositivo, fue definido un estándar de oro interno (IGS), a partir de un paciente en fase aguda de la infección.

El límite de detección del ensayo ha sido calculado en tres lotes, usando un equipo comercial europeo como referencia.

Se preparó una curva de dilución límite en plasma negativo.

Los resultados del control de calidad se muestran en la siguiente tabla:

Estándar de oro interno (IGS)

IGS	Lote n.º 1102	Lote n.º 0103	Lote n.º 0403	DiaSorin			
dilución	DO450nm	M/Co	DO450nm	M/Co	M/Co		
1 X	0.728	2.5	0.783	2.6	0.837	2.7	2.6
2 X	0.443	1.5	0.461	1.5	0.471	1.5	1.4
4 X	0.286	1.0	0.281	0.9	0.305	1.0	1.0
8 X	0.154	0.5	0.160	0.5	0.185	0.6	0.5
Plasma -	0.039	0.1	0.054	0.2	0.065	0.2	0.2

2. Especificidad y sensibilidad diagnóstica

La evaluación del rendimiento diagnóstico se realizó mediante un ensayo con más de 400 muestras frente a un equipo de referencia europeo realizado por el Prof. M. Rizzetto, Departamento de Gastro-Hepatología del hospital S. Giovanni Battista de Turín, Italia.

Se recogieron muestras positivas de pacientes en etapa aguda de la infección por HDV.

La especificidad clínica ha sido determinada utilizando paneles de más de 250 muestras, provenientes de individuos sanos y donantes de sangre, clasificadas como negativas mediante un equipo de referencia.

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

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

Se examinaron muestras procedentes de pacientes afectados por hepatitis víricas (HCV, HVA) y patologías no víricas del hígado, que pudieran provocar interferencia en el ensayo, sin embargo no se observó reacción cruzada.

El estudio del rendimiento se realizó mediante un ensayo con más de 400 muestras, en un centro de referencia externo cualificado. Se obtuvieron los siguientes valores:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

3. Reproducibilidad.

Ha sido calculada con tres muestras, examinadas en réplicas en series diferentes.

Se realizó un estudio con 3 muestras de diferente reactividad IgM HDV, examinadas en 16 réplicas, en tres series separadas.

Los valores medios obtenidos se facilitan a continuación:

DIM.CE:lote n.º 1102

Control negativo (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO450nm	0.061	0.056	0.056	0.058
Desviación estándar	0.008	0.007	0.007	0.008
CV %	13.9	13.0	12.9	13.3

Calibrador (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.798	0.810	0.802	0.803
Desviación estándar	0.044	0.041	0.046	0.044
CV %	5.5	5.1	5.7	5.4
M/Co	2.6	2.6	2.6	2.6

Control positivo (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	2.133	2.143	2.134	2.137
Desviación estándar	0.081	0.081	0.095	0.086
CV %	3.8	3.8	4.4	4.0
M/Co	6.9	7.0	7.0	7.0

DIM.CE:lote n.º 0103

Control negativo (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.062	0.059	0.066	0.062
Desviación estándar	0.008	0.005	0.006	0.006
CV %	12.4	9.3	9.2	10.3

Calibrador (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.843	0.843	0.826	0.837
Desviación estándar	0.051	0.051	0.045	0.049
CV %	6.0	6.0	5.4	5.8
M/Co	2.7	2.7	2.7	2.7

Control positivo (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	2.299	2.278	2.227	2.268
Desviación estándar	0.115	0.102	0.112	0.110
CV %	5.0	4.5	5.0	4.8
M/Co	7.4	7.4	7.0	7.3

DIM.CE:lote n.º 0403

Control negativo (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.066	0.070	0.067	0.068
Desviación estándar	0.006	0.008	0.008	0.007
CV %	9.8	10.7	11.3	10.6

Calibrador (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.800	0.813	0.815	0.809
Desviación estándar	0.044	0.046	0.049	0.046
CV %	5.5	5.7	6.0	5.7
M/Co	2.5	2.5	2.6	2.5

Control positivo (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	2.352	2.328	2.339	2.340
Desviación estándar	0.093	0.098	0.105	0.099
CV %	3.9	4.2	4.5	4.2
M/Co	7.5	7.3	7.4	7.4

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

Nota importante:

Los datos de rendimiento se obtuvieron siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 13.

S. LIMITACIONES

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

Las muestras que tras ser descongeladas presentan partículas de fibrina o agregados pueden generar algunos resultados falsos positivos.

T. PRUEBA DE CONFIRMACIÓN

La prueba de confirmación debe realizarse en todas las muestras positivas antes de remitir el diagnóstico de infección primaria por HDV al médico.

Proceder del modo siguiente para la confirmación:

1. Preparar el complejo antígeno/conjugado tal como se describe en la sección correspondiente. Este reactivo se denomina Solución A.
2. A continuación, se diluyen 25 µl de conjugado enzimático concentrado en 500 µl de diluyente para antígeno y mezclar suavemente usando un vórtex. ¡No utilizar ningún vial de antígeno HDV liofilizado para este procedimiento! Esta solución se denomina Solución B.
3. Dejar el pocillo A1 de la tira vacío para el blanco.
4. El Control negativo se dispensa en las posiciones B1+C1 de la tira. Esto se utiliza para el cálculo de los valores de corte y M/Co.
5. La muestra positiva a confirmar se dispensa diluida al 1:201 en las posiciones D1+E1 de la tira.
6. La tira se incuba durante 60 minutos a +37°C.
7. Tras el lavado, el pocillo blanco A1 se deja vacío.
8. Se dispensan 100 µl de Solución A en los pocillos B1+C1+D1.
9. A continuación, se añaden 100 µl de Solución B al pocillo E1.
10. La tira se incuba durante 60 minutos a +37°C.
11. Tras el lavado, se añaden 100 µl de cromógeno/sustrato a todos los pocillos y la tira se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente.
12. Se añaden 100 µl de ácido sulfúrico a todos los pocillos y entonces se mide la intensidad del color de éstos a 450nm (filtro de lectura) y a 620-630nm (substracción del fondo), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

La interpretación de los resultados se realiza del modo siguiente:

1. Si la muestra del pocillo D1 presenta un valor de M/Co inferior a 0.9, es probable que haya ocurrido un problema de dispensación o de contaminación en la primera prueba. Debe repetirse el procedimiento de ensayo descrito en la sección M, como doble comprobación del análisis.
2. Si la muestra de la posición D1 presenta un valor de M/Co superior a 1.1 y la muestra de la posición E1 presenta un valor de M/Co también superior a 1.1, la muestra se considera como un **falso positivo**. La reactividad de la muestra no es dependiente de la presencia específica de antígeno HDV y se ha producido una reacción cruzada con el anticuerpo policlonal marcado con HRP.
3. Si la muestra de la posición D1 presenta un valor de M/Co superior a 1.1 y la muestra de la posición E1 presenta un valor de M/Co inferior a 0.9, la muestra se considera como un **verdadero positivo**. La reactividad de la muestra es dependiente de la presencia específica de antígeno HDV y no es debida a ninguna reacción cruzada.

En la tabla siguiente se indica la interpretación de los resultados:

Pocillo	M/Co		
D1	< 0.9	> 1.1	> 1.1
E1	< 0.9	> 1.1	< 0.9
Interpretación	Problema de contaminación	Falso positivo	Verdadero positivo

BIBLIOGRAFÍA.

1. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunochemistry 8: 871-874, 1971
2. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol.. 109: 129-135, 1971
3. Chaggar K. Et al.. Journal of Virological Methods. 32: 193-199, 1991
4. Lazinski D.W. et al.. Journal of Virol.. 67: 2672-2680, 1993
5. Govindarajan S. et al.. Microbiol. And Immunol.. 95: 140-141, 1990
6. Shattock A.G. et al.. J.Clin.Microbiol.. 29: 1873-1876, 1991
7. Forbes B.A. et al.. Clin.Microbiol.News.. 13: 52-54, 1991
8. Bergmann, K. et al. J.Immunol. 143:3714-3721, 1989
9. Bergmann, K. et al. J.Infect.Dis. 154:702-706, 1986
10. Buti, M. et al. Hepatology 8:1125-1129, 1988
11. Rizzetto, M. Hepatology 3729-737, 1983
12. Rizzetto, M. et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77:6124-6128, 1980
13. Dubois, F. et al. J.Clin.Microbiol. 26:1339-1342, 1988
14. Wang, K. et al. Nature 323:508-514, 1986
15. Grebenchtchikov N. et al.. J.Immunol. Methods, 15(2) :219-231, 2002
16. Schrijver RS and Kramps JA, Rev.Sci.Tech. 17(2):550-561, 1998

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el marcado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:

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



0318

HDV Ab

**Competitive Enzyme Immunoassay
for the qualitative determination of
antibodies to Hepatitis Delta Virus
in human serum and plasma**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

HDV Ab

A. INTENDED USE

Competitive Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the qualitative determination of antibodies to Hepatitis Delta Virus or HDV in human plasma and sera with a "two-steps" methodology.

The kit is used for the follow-up of patients infected by HDV.

For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

The Hepatitis Delta Virus or HDV is a RNA defective virus composed of a core presenting the delta-specific antigen, encapsulated by HBsAg, that requires the helper function of HBV to support its replication.

Infection by HDV occurs in the presence of acute or chronic HBV infection. When acute delta and acute HBV simultaneously occur, the illness becomes severe and clinical and biochemical features may be indistinguishable from those of HBV infection alone. In contrast, a patient with chronic HBV infection can support HDV replication indefinitely, usually with a less severe illness appearing as a clinical exacerbation.

The determination of HDV specific serological markers (HDV Ag, HDV Ab, HDV IgM and HDV IgG) represents in these cases an important tool to the clinician for the classification of the etiological agent, for the follow up of infected patients and their treatment. The detection of HDV total antibodies allows the classification of the illness and the monitoring of the seroconversion event.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Anti-HDV antibodies, if present in the sample, compete with a virus-specific polyclonal IgG, labeled with peroxidase (HRP), for a fixed amount of rec-HDV coated on the microplate. The test is carried out with a two steps incubation competitive system. First the sample is added to the plate and specific anti HDV antibodies bind to the adsorbed antigen. After washing, an enzyme conjugated antibody to HDV is added and binds to the free portion of the antigen coated. After washing a chromogen/substrate mixture is dispensed. The concentration of the bound enzyme on the solid phase becomes inversely proportional to the amount of anti-HDV antibodies in the sample and its activity is detected by the added chromogen/substrate. The concentration of HDV-specific antibodies in the sample is determined by means of a cut-off value that allows for the semi quantitative detection of anti-HDV antibodies.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

8x12 microwell strips coated with recombinant HDV-specific antigen and sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

2. Negative Control: CONTROL -

1x2.0ml/vial. Ready to use. Contains goat serum proteins, 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 +/-0.1, 0.09% Sodium Azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The negative control is colour coded pale yellow.

3. Positive Control: CONTROL +

1x2.0ml/vial. Ready to use. Contains goat serum proteins, high titer anti HDV antibodies, 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 +/-0.1, 0.09% Sodium Azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The positive control is colour coded green.

4. Calibrator: CAL

n° 1 vial. Lyophilised. To be dissolved with EIA grade water as reported in the label. Contains bovine serum proteins, low titer human antibodies to HDV, 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

Note: The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label.

5. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle. 20x concentrated solution.

Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

6. Enzyme conjugate: CONJ

1x16ml/vial. Ready-to-use solution. Contains 5% bovine serum albumine, 10 mM tris buffer pH 6.8 +/-0.1, Horseradish peroxidase conjugated antibody to HDV in presence of 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The component is colour coded red.

7. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

1x16ml/vial. Contains a 50 mM citrate-phosphate buffered solution at pH 3.5-3.8, 4% DMSO, 0.03% tetra-methyl-benzidine or TMB and 0.02% hydrogen peroxide of H₂O₂.

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

8. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vial. Contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

Plate sealers n° 2

Instructions for Use n° 1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-borne microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen/Substrate (TMB/H₂O₂) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
5. Upon receipt, store the kit at +2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures.
8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
10. Do not use the kit after the expiration date stated on external (primary container) and internal (vials) labels.
11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. The use of disposable plastic labware is recommended in the preparation of the washing solution or in transferring components into other containers of automated workstations, in order to avoid contamination.
13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..
14. Accidental spills have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water.
16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND RECOMMENDATIONS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate.
3. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
4. Haemolysed (red) and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

5. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
6. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-uses of the device and up to 3 months.

1. Antigen coated microwells:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant has not turned dark green, indicating a defect in manufacturing. In this case, call Dia.Pro's customer service.

Unused strips have to be placed back into the aluminium pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°-8°C. When opened the first time, unused strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

2. Negative Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

3. Positive Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

4. Calibrator:

Low positive control. Add precisely the volume of EIA grade water, reported on its label, to the lyophilized powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex.

Note: The dissolved calibrator is not stable. Store it frozen in aliquots at -20°C. When thawed do not freeze again; discard it.

5. Wash buffer concentrate:

The whole content of the 20x concentrated solution has to be diluted with EIA grade water up to 1200 ml and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

6. Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, dust or microbes. If this component has to be transferred, use only plastic, and if possible, sterile disposable containers.

7. Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. Do not expose to strong light, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, and if possible, sterile disposable container

8. Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary **P statements:**

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (70% ethanol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample or the components of the kit. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +2%.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of ±0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).
5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350µl/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.
An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of ±5%.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to 4; (c) linearity to 4; repeatability ≥ 1%. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, shaking, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Validation of Test" and "Assay Performances". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for

dispensing samples and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells due to strongly reactive samples, leading to false positive results. The use of ELISA automated work stations is recommended for blood screening and when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.

7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure full compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates. Check that the Chromogen/Substrate is colorless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
4. Dissolve the Calibrator as described above and gently mix.
5. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
6. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
7. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
8. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
9. Check that the micropipettes are set to the required volume.
10. Check that all the other equipment is available and ready to use.
11. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

1. Place the required number of strips in the microplate holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking. Store the other strips into the bag in presence of the desiccant at +2..8°C, sealed.
2. Pipette 100 µl of Negative Control in triplicate, 100 µl Positive Control in single and then 100 µl of samples. Check that controls and samples have been correctly added. Then incubate the microplate at **+37°C for 60 min.**
3. Wash the microplate as reported in section I.3.
4. In all the wells except A1, pipette 100 µl Enzyme Conjugate. Check that the reagent has been correctly added. Then incubate the microplate at **+37°C for 60 min.**

Important note: Be careful not to touch the inner surface of the well with the pipette tip when dispensing the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

5. Wash the microplate as described.

6. Pipette 100 µl TMB/H₂O₂ mixture in each well, the blank wells included. Check that the reagent has been correctly added. Then incubate the microplate at **room temperature for 20 min**.

Important note: Do not expose to strong direct light as a high background might be generated.

7. Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step n° 6 to stop the enzymatic reaction. Addition of the stop solution will turn the negative control and negative samples from blue to yellow.

8. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5 using a 450nm filter (reading) and a 620-630nm filter (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

Important notes:

1. Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.
2. Reading has should ideally be performed immediately after the addition of the Stop Solution but definitely no longer than 20 minutes afterwards. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to a higher background.
3. The use of the Calibrator, a low positive control, is not mandatory for the assay as the CAL does not enter into the cut-off calculation. The CAL may be used as a low titer positive control when a laboratory internal quality verification is required by the management. When used for such purpose, dispense 100 µl of it, possibly in duplicate.

N. ASSAY SCHEME

Controls/Calibrator	100 µl
Samples	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Washing step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme Conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Washing step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H ₂ O ₂ mix	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm / 620-630nm

An example of dispensation scheme (including CAL) is reported in the table below:

Microplate

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

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

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A check is performed on the negative and positive controls any time, and on the Calibrator in addition when the kit is used for the first time, in order to verify whether the expected OD450nm / 620-630nm or Co/S values have been matched in the analysis. Ensure that the following parameters are met:

Parameter	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
Negative Control (NC)	> 1.000 OD450nm after blanking If lower carefully control the washing procedure and decrease the number of cycles or the soaking time coefficient of variation < 30%
Positive Control (PC)	OD450 nm < NC/10
Calibrator (CAL)	PC ≤ OD450nm < (NC+PC)/5

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

If they don't, do not proceed any further and perform the following checks:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	that the Chromogen/Substrate solution has not become contaminated during the assay
Negative Control (NC) < 1.000 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of negative control); 4. that no contamination of the negative control or of the wells where the control was dispensed has occurred due to positive samples, to spills or to the enzyme conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate; 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

Calibrator OD450nm Outside the range	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution (ex.: dispensation of negative control instead of Calibrator); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
Positive Control OD450nm > NC/10	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during the distribution of the control (dispensation of negative control instead of positive control). 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

If any of the above problems have occurred, report the problem to the supervisor for further actions.

Important note:

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 8.

P. RESULTS

The results are calculated by means of a cut-off value determined with the following formula:

$$\text{Cut-Off} = (\text{NC} + \text{PC}) / 5$$

Important note: When the calculation of results is performed by the operating system of an ELISA automated work station, ensure that the proper formulation is used to calculate the cut-off value and generate the correct interpretation of results.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Results are interpreted as ratio between the cut-off value and the sample OD450nm / 620-630nm or Co/S. Results are interpreted according to the following table:

Co/S	Interpretation
< 0.9	Negative
0.9 – 1.1	Equivocal
> 1.1	Positive

A negative result indicates that the patient has not been infected by HDV.

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

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

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgement errors and misinterpretations.
2. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
3. Diagnosis of viral hepatitis infection has to be taken by and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 8).

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

Negative Control: 2.100 – 2.200 – 2.000 OD450nm

Mean Value: 2.100 OD450nm

Higher than 1.000 – Accepted

Positive Control: 0.100 OD450nm

Lower than NC/10 – Accepted

$$\text{Cut-Off} = (2.100 + 0.100) / 5 = 0.440$$

Calibrator: 0.300-0.260 OD450nm

Mean value: 0.280 OD450nm

Within the range $\text{PC} \leq \text{OD450nm} < (\text{NC} + \text{PC})/5$ – Accepted

Sample 1: 0.020 OD450nm

Sample 2: 1.900 OD450nm

Sample 1 Co/S > 1.1 positive

Sample 2 Co/S < 0.9 negative

R. PERFORMANCES

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what reported in the Common Technical Specifications or CTS (art. 5, Chapter 3 of IVD Directive 98/79/EC)

1. LIMIT OF DETECTION:

In absence of an international standard, the sensitivity of the assay has been calculated by means of the product named Accurun n° 127 supplied by Boston Biomedica Inc. – USA . The table below reports the OD450nm shown by this preparation when diluted in Fetal Calf Serum to prepare a limiting dilution curve, in three different lots.

Co/S values

	DAB.CE	Lot # 1102	DAB.CE	Lot # 0103	DAB.CE	Lot # 0403
Accurun # 127	OD450 nm	Co/S value	OD450 nm	Co/S value	OD450 nm	Co/S value
1x	0.171	3.0	0.163	2.9	0.156	2.8
2x	0.187	2.7	0.176	2.6	0.179	2.5
4x	0.230	2.2	0.220	2.1	0.202	2.2
8x	0.298	1.7	0.285	1.6	0.271	1.6
16x	0.417	1.2	0.405	1.1	0.402	1.1
32x	0.514	1.0	0.490	0.9	0.482	0.9
64x	0.717	0.7	0.700	0.7	0.705	0.6
128x	1.063	0.5	1.006	0.5	1.015	0.4
CTRL (-)	2.484	////////	2.261	////////	2.114	////////

2. DIAGNOSTIC SPECIFICITY AND SENSITIVITY

The diagnostic performances were evaluated in a clinical trial conducted by the Department of Gastro-Hepatology, Prof. M.Rizzetto, S.Giovanni Battista hospital, Torino, Italy, on more than 400 samples against a reference kit.

Negative, positive and potentially interfering samples were examined in the trial.

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

Results are briefly reported in the tables below:

Sensitivity	> 98 %
Specificity	> 98 %

3. PRECISION

The mean values obtained from a study conducted on two samples of different anti-HDV antibody reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs for three lots of product, is reported below:

DAB.CE: lot #1102

Negative Control (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.342	2.428	2.433	2.401
Std.Deviation	0.113	0.106	0.122	0.114
CV %	4.8	4.4	5.0	4.7

Calibrator (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.298	0.289	0.286	0.291
Std.Deviation	0.023	0.027	0.026	0.025
CV %	7.7	9.3	9.1	8.7
Co/S	1.6	1.7	1.7	1.7

DAB.CE: lot #0103

Negative Control (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.208	2.237	2.246	2.230
Std.Deviation	0.105	0.108	0.108	0.107
CV %	4.7	4.8	4.8	4.8

Calibrator (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.269	0.277	0.266	0.271
Std.Deviation	0.026	0.024	0.025	0.025
CV %	9.8	8.5	9.5	9.3
Co/ S	1.7	1.7	1.7	1.7

DAB.CE: lot # 0403

Negative Control (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.246	2.221	2.182	2.216
Std.Deviation	0.097	0.103	0.118	0.106
CV %	4.3	4.6	5.4	4.8

Calibrator (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.286	0.273	0.280	0.280
Std.Deviation	0.027	0.023	0.026	0.025
CV %	9.3	8.5	9.1	9.0
Co/S	1.6	1.7	1.6	1.6

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

Important note:

The performance data have been obtained proceeding as the reading step described in the section M, point 8.

S. LIMITATIONS

Bacterial contamination or heat inactivation of the specimen may affect the absorbance values of the samples with consequent alteration of the level of the analyte.

This test is suitable only for testing single samples and not pooled ones.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. The patient's clinical history, symptomatology, as well as other diagnostic data should be considered.

REFERENCES

1. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunochemistry 8: 871-874, 1971
2. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol.. 109: 129-135, 1971
3. Chaggar K. Et al.. Journal of Virological Methods. 32: 193-199, 1991
4. Lazinski D.W. et al.. Journal of Virol.. 67: 2672-2680, 1993
5. Govindarajan S. et al.. Microbiol. And Immunol.. 95: 140-141, 1990
6. Shattock A.G. et al.. J.Clin.Microbiol.. 29: 1873-1876, 1991
7. Forbes B.A. et al.. Clin.Microbiol.News.. 13: 52-54, 1991
8. Bergmann, K. et al. J.Immunol. 143:3714-3721, 1989
9. Bergmann, K. et al. J.Infect.Dis. 154:702-706, 1986
10. Buti, M. et al. Hepatology 8:1125-1129, 1988
11. Rizzetto, M. Hepatology 3729-737, 1983
12. Rizzetto, M. et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77:6124-6128, 1980
13. Dubois, F. et al. J.Clin.Microbiol. 26:1339-1342, 1988
14. Wang, K. et al. Nature 323:508-514, 1986

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italy

CE
0318

HDV Ab

**Ensayo inmunoenzimático competitivo
para la determinación cualitativa de
anticuerpos frente al Virus de la
Hepatitis Delta
en plasma y suero humanos**

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro"



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF DAB.CE
96 pruebas

HDV Ab

A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

Ensayo inmunoenzimático competitivo (ELISA) para la determinación cualitativa de anticuerpos frente al Virus de la Hepatitis Delta (HDV) en plasma y suero humanos con una metodología de "dos pasos".

El equipo ha sido desarrollado para el seguimiento de pacientes infectados con HDV.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN.

El Virus de la Hepatitis Delta es un virus ARN defectivo. Se compone de un núcleo con los antígenos delta específicos, y está encapsulado por el HBsAg. Para su replicación necesita ayuda funcional de HBV.

La infección por HDV ocurre en presencia de una infección aguda o crónica por HBV. Cuando se presenta simultáneamente la infección aguda por los dos virus, la enfermedad es grave y el cuadro clínico, así como las características bioquímicas son prácticamente indistinguibles de una infección por HBV. Sin embargo, una persona infectada por HBV de forma crónica puede soportar indefinidamente la replicación por HDV, normalmente la enfermedad es menos severa y aparece como exacerbadión clínica.

La determinación de los marcadores serológicos específicos de HDV (HDV Ag, HDV Ab, HDV IgM y HDV IgG) representa una herramienta importante para los clínicos en la clasificación del agente etiológico, en el seguimiento de los pacientes así como en el tratamiento.

La detección de anticuerpos totales permite la clasificación de la enfermedad y el seguimiento de la seroconversión.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El ensayo es de tipo competitivo, donde los anticuerpos anti-HDV de la muestra compiten con un anticuerpo policlonal (IgG) específico para el virus y conjugado con peroxidasa (HRP), por el antígeno recombinante-HDV de la fase sólida.

El ensayo se realiza mediante un sistema de dos pasos con incubación competitiva. La muestra se añade a la placa y los anticuerpos específicos anti-HDV se combinan con el antígeno de la fase sólida. Después del lavado, se añade un anticuerpo conjugado con peroxidasa (HRP) que se une al antígeno libre en la placa. Previo lavado, se añade el substrato cromogénico.

La concentración de la enzima conjugada, unida a la fase sólida es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos al HDV presentes en la muestra y su actividad se detecta por la adición del substrato cromogénico.

La concentración de anticuerpos específicos al HDV en la muestra se determina de manera semicuantitativa a través del cálculo de un valor de corte.

D. COMPONENTES.

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLATE

12 tiras de 8 pocillos recubiertos con antígeno recombinante específico de HDV, en bolsas selladas con desecante. Se deben poner las placas a temperatura ambiente antes de abrirlas, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y almacenar a 4°C.

2. Control Negativo: CONTROL -

1x2.0ml/vial. Listo para el uso. Contiene proteínas del suero de cabra, tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.4 +/-0.1, además de azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes. El control negativo está codificado con el color amarillo pálido.

3. Control Positivo: CONTROL +

1x2.0ml/vial. Listo para el uso. Contiene proteínas del suero de cabra, alto título de anticuerpos anti-HDV, tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.4 +/-0.1, además de azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes. El control positivo está codificado con el color verde.

4. Calibrador: CAL ...

n° 1 vial. Liofilizado. Para disolver en agua calidad EIA como se indica en la etiqueta. Contiene suero bovino fetal, bajo título de anticuerpos humanos al HDV, además de sulfato de gentamicina 0.02 mg/ml y ProClin 300 0.045% como conservantes.

Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del frasco, varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen indicado en la etiqueta.

5. Tampón de Lavado Concentrado: WASHBUF 20X

1x60ml/botella. Solución concentrada 20x.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, Tween 20 al 0.05% y ProClin 300 al 0.045%

6. Conjugado CONJ

1x16ml/vial. Solución lista para el uso. Contiene 5% de albúmina de suero bovino, tampón Tris 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, anticuerpo anti-HDV conjugado con peroxidasa (HRP) en presencia de 0.2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 0.045% como conservante. El conjugado está codificado con el color rojo.

7. Cromógeno/Substrato SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato-fosfato 50mM pH 3.5-3.8, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02% así como dimetilsulfóxido 4%.

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

8. Ácido Sulfúrico: H₂SO₄ 0.3M

1x15ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0.3M

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

Sellador adhesivo, n° 2

Manual de instrucciones, n° 1

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (10-1000 µl) y puntas plásticas desechables.
2. Agua de calidad EIA (Bidestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) fijo a 37°C.
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El equipo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar las ropas protectoras adecuadas de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal

debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.

3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los equipos, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del sustrato (TMB/H₂O₂) a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar reactivos de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos.
7. Comprobar que los reactivos no contienen precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en el equipo e internamente en los reactivos.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.
13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben de ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según las técnicas estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Evitar el uso de conservantes, en particular azida sódica, ya que pudiera afectar la actividad enzimática del conjugado.

3. Las muestras deben estar identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Cuando el equipo se emplea para el pesquaje en unidades de sangre, se recomienda el uso del código de barras.
4. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
5. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses. Evitar congelar/descongelar cada muestra más de una vez, ya que pueden generarse partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
6. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en equipos abiertos, en uso por un período de hasta 3 meses.

1. Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación. De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas, deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes, se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie de amarillo a verde.

2. Control Negativo:

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

3. Control Positivo:

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

4. Calibrador:

Control positivo bajo. Añadir de manera precisa al polvo liofilizado el volumen de agua de calidad EIA indicado en la etiqueta. Dejar disolver totalmente y mezclar suavemente en el vórtex.

Note: Una vez reconstituida, la solución no es estable. Se recomienda mantenerla congelada en alícuotas a -20°C. Cuando se descongele, descartar el agua en lugar de congelarla nuevamente.

5. Solución de Lavado Concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada hasta 1200ml y mezclarse suavemente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

6. Conjugado:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

7. Cromógeno/ Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

8. Ácido Sulfúrico:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Leyenda:

Indicación de peligro, **Frases H**

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, **Frases P**

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

- Las micropipetas deben ser calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (etanol 70%, lejía 10%, de calidad de los desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%.
- La incubadora de ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
- El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible

remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.

- Los tiempos de incubación deben tener un margen de $\pm 5\%$.
- El lector de microplaca ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro de 620-630 nm, obligatorio para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda $\leq 10\text{nm}$ b) Rango de absorbancia de 0 a 4, c) Linealidad a 4, reproducibilidad $\geq 1\%$. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar que se mide la densidad óptica correcta. Periódicamente debe procederse al mantenimiento según las instrucciones del fabricante.
- En caso de usar un sistema automatizado de ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en las secciones "Control interno de calidad" y "Procedimiento del ensayo". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y las de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos por contaminación de los pocillos adyacentes por muestras fuertemente reactivas. Se recomienda el uso de sistemas automatizados para el pesquaje en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.
- El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

- Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del equipo (envase primario). No usar si ha caducado.
- Compruebe que los componentes líquidos no están contaminados con partículas o agregados visibles. Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico. Compruebe que no han ocurrido rupturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
- Diluir totalmente la solución de lavado 20x concentrada, como se ha descrito anteriormente.
- Disolver el Calibrador como se ha descrito anteriormente y mezclar suavemente usando un vórtex.
- Dejar los componentes restantes alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
- Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y cebar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
- Comprobar que el lector de ELISA esté conectado al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
- En caso de trabajar automáticamente, conectar el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
- Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
- Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.

11. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

1. Poner el número necesario de tiras en el soporte plástico. Dejar el pocillo A1 vacío para el blanco. Almacenar las tiras restantes en la bolsa con el desecante a temperaturas entre 2 y 8°C.

2. Dispensar 100µl del Control Negativo, por triplicado, 100µl del Control Positivo una vez y, posteriormente, añadir 100µl de muestras. Comprobar que los controles y muestras se han añadido correctamente.

Después incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.

3. Lavar la microplaca según lo descrito previamente (sección I.3).

4. Dispensar 100µl de Conjugado en todos los pocillos, excepto A1; comprobar que los reactivos se han añadido correctamente. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.

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

5. Lavar la microplaca según lo descrito previamente (sección I.3).

6. Dispensar 100µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1.

Incubar la microplaca protegida de la luz a **temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

7. Dispensar 100µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 6. La adición de la solución de parada cambia el color del Control Negativo y las muestras negativas de azul a amarillo.

8. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección I.5, con un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

Notas importantes:

- Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
- La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.
- El uso del calibrador (CAL), un control negativo bajo, no es obligatorio para el ensayo ya que el calibrador (CAL) no afecta al cálculo del valor de corte. El calibrador (CAL) puede usarse como un control negativo bajo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio. Dispensar 100µl del calibrador (CAL), posiblemente por duplicado, cuando se utilice para este propósito.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO.

Controles/Calibrador	100 µl
Muestras	100 µl
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Conjugado	100 µl
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Mezcla TMB/H2O2	100 µl
3ª incubación	20 min
Temperatura	t.a.*
Ácido Sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450nm / 620-630nm

t.a.* temperatura ambiente

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado (incluido el calibrador (CAL):

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

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

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza un grupo de pruebas con los controles negativo y positivo cada vez que se usa el equipo, y con el calibrador la primera vez que se usa el equipo, para verificar si los valores DO450nm o Co/M son los esperados.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Exigencia
Pocillo Blanco	valor < 0.100 DO450nm
Control Negativo (CN)	> 1.000 DO450nm después de leer el blanco Si es menor, controle cuidadosamente el proceso de lavado y disminuya los ciclos o el tiempo entre los mismos. Coeficiente de variación < 30%
Control Positivo (CP)	DO450 nm < CN/10
Calibrador (CAL)	CP ≤ DO450nm < (CN+CP)/5

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

En caso contrario, no siga adelante y compruebe:

Problema	Compruebe que
Pocillo blanco > 0.100DO450nm	la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
Control	1. el proceso de lavado y los parámetros

Negativo (CN) < 1.000 DO450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación > 20%	del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido cebado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del control negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
Calibrador DO450nm Fuera de rango	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el control negativo en lugar del calibrador). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
Control Positivo DO450nm > CN/10	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control negativo en lugar del positivo). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si ocurre alguno de los problemas anteriores, informe al responsable para tomar las medidas pertinentes.

Nota importante:

El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 8.

P. RESULTADOS.

Los resultados se calculan por medio de un valor de corte (cut-off) hallado con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de corte} = (\text{CN} + \text{CP}) / 5$$

Nota Importante: Cuando el cálculo de los resultados se halla mediante el sistema operativo de un equipo de ELISA automático, asegurarse de que la formulación usada para el cálculo del valor de corte, y para la interpretación de los resultados sea correcta.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

La interpretación de los resultados se realiza mediante la razón entre las DO a 450nm / 620-630nm de las muestras y el Valor de corte Co/M.

Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

Co/M	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9 - 1.1	Equívoco
> 1.1	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no está infectado por HDV.

Cualquier paciente, cuya muestra resulte equívoca debe someterse a una nueva prueba con una segunda muestra de sangre colectada 1 ó 2 semanas después de la inicial.

Un resultado positivo es indicativo de infección por HDV y por consiguiente el paciente debe ser tratado adecuadamente.

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
2. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
3. El diagnóstico de infección con un virus de la hepatitis debe ser evaluado y comunicado al paciente por un médico calificado.

A continuación se incluye un ejemplo de los cálculos (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 8).

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

Control Negativo: 2.100 – 2.200 – 2.000 DO450nm

Valor medio: 2.100 DO450nm

Mayor de 1.000 – Válido

Control Positivo: 0.100 DO450nm

Menor de CN/10 – Válido

$$\text{Valor de corte} = (2.100 + 0.100) / 5 = 0.440$$

Calibrador: 0.300-0.260 DO450nm

Valor medio: 0.280 DO450nm

Dentro del rango $CP \leq DO450nm < (CN+CP)/5$ – Válido

Muestra 1: 0.020 DO450nm

Muestra 2: 1.900 DO450nm

Muestra 1 Co/M > 1.1 positiva

Muestra 2 Co/M < 0.9 negativa

R. FUNCIONAMIENTO.

La evaluación del funcionamiento ha sido realizada según lo reportado en las Especificaciones Técnicas Comunes (ETC) (art. 5, Capítulo 3 de las Directivas IVD 98/79/EC).

1. LÍMITE DE DETECCIÓN.

En ausencia de un estándar internacional, la sensibilidad del ensayo ha sido calculada por medio de un producto denominado Accurun n° 127 suministrado por Boston Biomedical Inc., Estados Unidos.

La siguiente tabla muestra los valores de DO450nm para esta preparación, diluido en suero bovino fetal (SFB), para construir la curva de dilución límite en tres lotes diferentes:

Valores Co/M						
	DAB.CE	Lote #	DAB.CE	Lote #	DAB.CE	Lote #
	DO450	Co/M	DO450	Co/M	DO450	Co/M
Accurun # 127	nm	valor	nm	valor	nm	valor
1x	0.171	3.0	0.163	2.9	0.156	2.8
2x	0.187	2.7	0.176	2.6	0.179	2.5
4x	0.230	2.2	0.220	2.1	0.202	2.2
8x	0.298	1.7	0.285	1.6	0.271	1.6
16x	0.417	1.2	0.405	1.1	0.402	1.1
32x	0.514	1.0	0.490	0.9	0.482	0.9
64x	0.717	0.7	0.700	0.7	0.705	0.6
128x	1.063	0.5	1.006	0.5	1.015	0.4
CTRL (-)	2.484	////////	2.261	////////	2.114	////////

2. ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICA.

La evaluación del procedimiento diagnóstica se realizó mediante un ensayo con más de 400 muestras frente a un equipo de referencia. Este ensayo clínico fue conducido por el Prof. M. Rizzetto, Departamento de Gastro-Hepatología del hospital S. Giovanni Battista de Turín, Italia.

Se examinaron muestras negativas, positivas y otras que pudieran provocar interferencia.

Se emplearon además plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrate, EDTA y heparina) y suero humanos. No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

A continuación se muestran brevemente los resultados obtenidos:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

3. PRECISIÓN.

Se realizó un estudio con 3 lotes y dos muestras de diferente reactividad anti-HDV, examinadas en 16 réplicas, en tres tandas separadas. Los valores medios obtenidos se reportan a continuación:

DAB.CE: lote #1102

Control Negativo (N = 16)

Valores medios	1ª tanda	2ª tanda	3ª tanda	Valor Promedio
DO 450nm	2.342	2.428	2.433	2.401
Desviación estándar	0.113	0.106	0.122	0.114
CV %	4.8	4.4	5.0	4.7

Calibrador (N = 16)

Valores medios	1ª tanda	2ª tanda	3ª tanda	Valor Promedio
DO 450nm	0.298	0.289	0.286	0.291
Desviación estándar	0.023	0.027	0.026	0.025
CV %	7.7	9.3	9.1	8.7
Co/M	1.6	1.7	1.7	1.7

DAB.CE: lote #0103

Control Negativo (N = 16)

Valores medios	1ª tanda	2ª tanda	3ª tanda	Valor Promedio
DO 450nm	2.208	2.237	2.246	2.230
Desviación estándar	0.105	0.108	0.108	0.107
CV %	4.7	4.8	4.8	4.8

Calibrador (N = 16)

Valores medios	1ª tanda	2ª tanda	3ª tanda	Valor Promedio
DO 450nm	0.269	0.277	0.266	0.271
Desviación estándar	0.026	0.024	0.025	0.025
CV %	9.8	8.5	9.5	9.3
Co/M	1.7	1.7	1.7	1.7

DAB.CE: lote # 0403

Control Negativo (N = 16)

Valores medios	1ª tanda	2ª tanda	3ª tanda	Valor Promedio
DO 450nm	2.246	2.221	2.182	2.216
Desviación estándar	0.097	0.103	0.118	0.106
CV %	4.3	4.6	5.4	4.8

Calibrador (N = 16)

Valores medios	1ª tanda	2ª tanda	3ª tanda	Valor Promedio
DO 450nm	0.286	0.273	0.280	0.280
Desviación estándar	0.027	0.023	0.026	0.025
CV %	9.3	8.5	9.1	9.0
Co/M	1.6	1.7	1.6	1.6

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

Nota importante:

Los datos de rendimiento se obtuvieron siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 8.

S. LIMITACIONES.

La contaminación bacteriana de las muestras o la inactivación por calor pueden modificar los valores de absorbancia con la consiguiente alteración de los niveles del analito. Este ensayo es adecuado solo para el análisis de muestras individuales y no para mezclas.

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no se debe formular en base al resultado de un solo ensayo, sino que es necesario tomar en consideración la historia clínica y la sintomatología del paciente así como otros datos diagnósticos.

BIBLIOGRAFÍA.

- Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunochimistry 8: 871-874, 1971
- Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol.. 109: 129-135, 1971
- Chaggar K. Et al.. Journal of Virological Methods. 32: 193-199, 1991
- Lazinski D.W. et al.. Journal of Virol.. 67: 2672-2680, 1993
- Govindarajan S. et al.. Microbiol. And Immunol.. 95: 140-141, 1990
- Shattock A.G. et al.. J.Clin.Microbiol.. 29: 1873-1876, 1991
- Forbes B.A. et al.. Clin.Microbiol.News.. 13: 52-54, 1991
- Bergmann, K. et al. J.Immunol. 143:3714-3721, 1989
- Bergmann, K. et al. J.Infect.Dis. 154:702-706, 1986
- Buti, M. et al. Hepatology 8:1125-1129, 1988
- Rizzetto, M. Hepatology 3729-737, 1983
- Rizzetto, M. et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77:6124-6128, 1980
- Dubois, F. et al. J.Clin.Microbiol. 26:1339-1342, 1988
- Wang, K. et al. Nature 323:508-514, 1986

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el marcado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:

Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.

Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (Mi) – Italia



0318

HP IgA

**Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for
the quantitative/qualitative
determination of IgA antibodies to
Helicobacter pylori
in human serum and plasma**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

HP IgA

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the quantitative/qualitative determination of IgA antibodies to *Helicobacter pylori* in human plasma and sera. The product is intended for the follow-up of patients showing gastrointestinal pathologies referable to *H.pylori* infection.

For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

Helicobacter pylori (HP) is a Gram negative bacterium, firstly isolated in gastric mucosa by Marshall and Warren in 1983.

Hp has been recognized to be the agent responsible of most of cases of gastric mucosal damage and to play a role in the evolution of gastric diseases to carcinoma.

Hp causes an immunological response during infection and specific antibodies of the different classes of IgG, IgA and IgM are produced by the patient.

ELISA are currently used to screen patients affected by gastritis or peptic ulcers for acute active infection due to some *Helicobacter pylori* virulent strains.

In particular the presence of IgA and IgM antibodies is reported to be correlated to the acute phase of illness, while IgG antibodies become present at different titers shortly after primary infections and last in blood for many years.

Quantitative ELISA are also used in the follow-up of patients undergoing antibiotic therapy, useful in monitoring IgG titer variations during and after the pharmaceutical treatment

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with *H.pylori* immunodominant antigens derived from tissue culture of a virulent strain.

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

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

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

IgA in the sample may therefore be quantitated by means of a standard curve calibrated in arbitrary units per milliliter (arbU/ml) as no international standard is available.

Neutralization of IgG anti-HP, carried out directly in the well, is performed in the assay in order to block interferences due to this class in the determination of IgA.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 microwells coated with HP specific immunodominant antigens derived from tissue culture of a virulent strain. Plates are sealed into a bag with desiccant.

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

2. Calibration Curve: CAL N° ...

Ready to use and color coded standard curve ranging:

4 ml CAL1 = 0 arbU/ml

4 ml CAL2 = 5 arbU/ml

2 ml CAL3 = 10 arbU/ml

2 ml CAL4 = 20 arbU/ml

2 ml CAL 5 = 50 arbU/ml

4 ml CAL6 = 100 arbU/ml.

Standards are calibrated against an internal Gold Standard or IGS as no international one is defined.

Contains human serum proteins, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. Standards are blue color coded.

3. Control Serum: CONTROL ...ml

1 vial. Lyophilized. It contains fetal bovine serum proteins, human IgA antibodies to HP at about 20 arbU/ml±20%, 0.3 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

4. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle20x concentrated solution.

Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

5. Enzyme conjugate: CONJ

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

6. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

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

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

7. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vialIt contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

8. Specimen Diluent: DILSPE

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

9. Neutralizing Reagent: SOLN NEUT

1x8ml/vial. Ready-to-use Reagent. It contains goat anti hIgG, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

10. Plate sealing foils n°2

11. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been

observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.

2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.

3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be freezed/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.

5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of storage.

In this case call Dia.Pro's customer service.

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

Calibration Curve

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

Control Serum

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilised powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex.

Note: The control after dissolution is not stable. Store frozen in aliquots at -20°C.

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

Sample Diluent

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

Neutralizing Reagent

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

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/- 0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).
5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.
An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of ±5%.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter (620-630nm, mandatory) for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0; (c) linearity to ≥ 2.0; repeatability ≥ 1%. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure

that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.

6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dissolve the content of the Control Serum as reported.
6. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
7. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
8. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
9. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
10. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
11. Check that the micropipettes are set to the required volume.
12. Check that all the other equipment is available and ready to use.
13. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

The kit may be used for quantitative and qualitative determinations as well.

M1. QUANTITATIVE DETERMINATION:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the A1 and B1 empty for the operation of blanking.
3. Dispense 50 µl of the Neutralizing Reagent (SOLN NTR) in all the wells of the samples. Do not add it in the wells used for the Calibrators and the Control Serum !

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

4. Then dispense 100 µl of Calibrators and 100 µl Control Serum in duplicate. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
5. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

6. Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section I.3).
7. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except A1+B1 blanking wells, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1 and B1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

8. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
9. Wash microwells as in step 5.
10. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank wells A1 and B1 included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

11. Pipette 100 µl Sulphuric Acid to stop the enzymatic reaction into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
12. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1 or B1 or both.

M2. QUALITATIVE DETERMINATION

If only a qualitative determination is required, proceed as described below:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.

3. Dispense 50 µl of the Neutralizing Reagent (SOLN NTR) in all the wells of the samples. Do not add it in the wells used for the Calibrators !

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

4. Dispense 100 µl of Calibrator 0 arbU/ml and Calibrator 5 arbU/ml in duplicate and Calibrator 100 arbU/ml in single. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
5. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

6. Wash the microplate with an automatic as reported previously (section I.3).
7. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the A1 well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

8. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
9. Wash microwells as in step 6.
10. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

11. Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
12. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

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

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Neutralizing Reagent (only for samples)	50 µl
Calibrators & Control(*)	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20'' of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min

Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3 rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm/620-630nm

(*) Important Notes:

- The Control Serum (CS) does not affect the test's results calculation.
- The Control Serum (CS) used only if a laboratory internal quality control is required by the Management.

An example of dispensation scheme for Quantitative Analysis is reported below:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S1									
B	BLK	CAL4	S2									
C	CAL1	CAL5	S3									
D	CAL1	CAL5	S4									
E	CAL2	CAL6	S5									
F	CAL2	CAL6	S6									
G	CAL3	CS(*)	S7									
H	CAL3	CS(*)	S8									

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrator
CS(*)= Control Serum- Not mandatory S = Sample

An example of dispensation scheme in qualitative assays is reported below:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S3	S11									
B	CAL1	S4	S12									
C	CAL1	S5	S13									
D	CAL2	S6	S14									
E	CAL2	S7	S15									
F	CAL6	S8	S16									
G	S1	S9	S17									
H	S2	S10	S18									

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrators
S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as qualified.

Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
CAL 1 0 arbU/ml	< 0.150 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
CAL 2 5 arbU/ml	OD450nm > OD450nm CAL1 + 0.100
CAL 6 100 arbU/ml	OD450nm > 1.000

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

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

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Sustrate solution has not got contaminated during the assay
CAL 1 0 arbU/ml > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive calibrator instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative calibrator or of their wells has occurred due spills of positive samples or the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
CAL 2 5 arbU/ml OD450nm < OD450nm CAL1 + 0.100	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (e.g.: dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
CAL 6 100 arbU/ml < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

**** Note:**

If Control Serum has used, verify the following data:

Check	Requirements
Control Serum	Mean OD450nm CAL4 ± 20%

If the results of the test doesn't match the requirements stated above, operate as follows:

Problem	Check
Control Serum Different from expected value	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the control has occurred.

Anyway, if all other parameters (Blank, CAL1, CAL2, CAL 6), match the established requirements, the test may be considered valid.

Important note:

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 12.

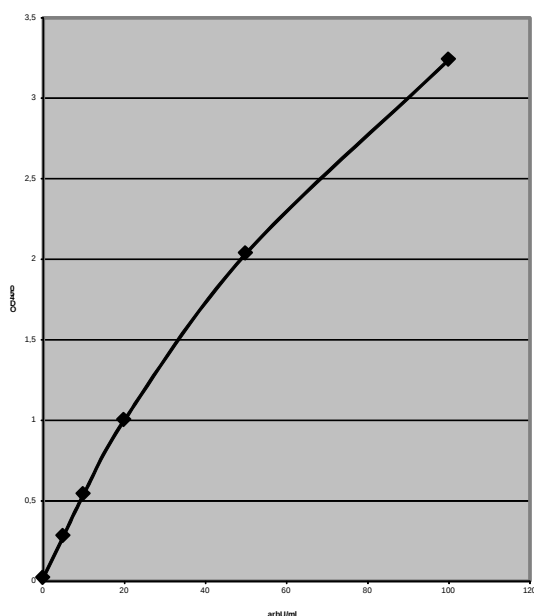
P. RESULTS

P.1 Quantitative method

If the test turns out to be valid, use for the quantitative method an approved curve fitting program to draw the calibration curve from the values obtained by reading at 450nm/620-630nm (4-parameters interpolation is suggested).

Then on the calibration curve calculate the concentration of anti H.pylori IgA antibody in samples.

An example of Calibration curve is reported below.



Important Note:

Do not use the calibration curve above to make calculations.

P.2 Qualitative method

In the qualitative method, calculate the mean OD450nm/620-630nm values for the Calibrators 0 and 5 arbU/ml and then check that the assay is valid.

Example of calculation (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 12):

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

Calibrator 0 arbU/ml: 0.020 – 0.024 OD450nm
Mean Value: 0.022 OD450nm
Lower than 0.150 – Accepted

Calibrator 5 arbU/ml: 0.250 – 0.270 OD450nm
Mean Value: 0.260 OD450nm
Higher than Cal 0 + 0.100 – Accepted

Calibrator 100 arbU/ml: 2.045 OD450nm
Higher than 1.000 – Accepted

The OD450nm/620-630nm of the Calibrator 5 arbU/ml is considered the cut-off (or Co) of the system.

The ratio between the OD450nm/620-630nm value of the sample and the OD450nm/620-630nm of the Calibrator 5 arbU/ml (or S/Co) can provide a semi-quantitative estimation of the content of specific IgG in the sample.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Samples with a concentration lower than 5 arbU/ml are considered negative for anti H.pylori IgA antibody.

Samples with a concentration higher than 5 arbU/ml are considered positive for anti H.pylori IgA antibody.

Important notes:

1. *H.pylori IgA results alone are not enough to provide a clear diagnosis of Helicobacter pylori infection. Other tests for Helicobacter pylori (supplied by Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. at code n° HPAG.CE, HPG.CE and HPM.CE), should be carried out.*
2. *Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.*
3. *When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.*
4. *Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.*

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted on panels of positive and negative samples in an external clinical laboratory with reference to a FDA approved reference kit.

1. Limit of detection

No international standard for HP IgA Antibody detection has been defined so far by the European Community.

In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient with an history of past HP infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The diagnostic performances were evaluated in a performance evaluation study conducted in an external center, with excellent experience in the diagnosis of infectious diseases.

The **diagnostic sensitivity** was studied in an external study on more than 50 samples, pre-tested positive with the reference kit of European origin in use at the laboratory. Positive samples were collected from patients with a clinical history of H.pylori infection.

The **diagnostic specificity** was determined in an external study on panels of more than 100 negative samples from normal individuals and blood donors, classified negative with the reference kit, including potentially interfering specimens.

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

In addition 35 cross-reacting specimens were studied internally to verify absence of interference on the assay results.

No interference was observed (100% specificity).

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

The external Performance Evaluation provided the following values :

Sensitivity	> 98 %
Specificity	> 98 %

3. Reproducibility:

A study conducted on three samples of different HP IgA reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs has

shown CV% values ranging 7-18% depending on the OD450nm/620-630nm readings.
The variability shown in the tables did not result in sample misclassification.

S. LIMITATIONS

False positivity has been assessed as less than 2% of the normal population.
Frozen samples containing fibrin particles or aggregates may generate false positive results.

REFERENCES

1. Lazzaroni M. et al.. Medicina (1989), 9, 9-18.
2. Vaira D. et al.. Federazione Medica XLI (1988), 7, 549-555.
3. Oderda G. Et al.. The Lancet (1989), vol.6, 7, 358-360.
4. Loffeld H. et al.. The Lancet (1989) vol.6, 10, 554-556
5. Vaira D. et al.. British Medical Journal (1988), vol.9, 43, 374-375.
6. Oderda G. et a.. Gut (1989), vol. 30, 7, 912-916.
7. Vaira D. et al.. Ital.J.Gastroenterol. (1988), 20, 299-304.
8. Vaira D. et al.. Current Opinion in Gastroenterology (1989), 5, 817-823.

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System in compliance with ISO 13485 rule. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:

Dia.Pro Diagnostic Bioprobes Srl

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



HP IgA

**Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para
la determinación cuantitativa/cualitativa
de anticuerpos IgA frente a
Helicobacter pylori
en suero y plasma humano**

Uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*



DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

HP IgA

A. OBJETIVO DEL ESTUCHE

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cuantitativa/cualitativa de anticuerpos IgA frente a *Helicobacter pylori* en suero y plasma humano. El producto ha sido diseñado para el estudio de pacientes que muestran patología gastrointestinal producida por infección de *H. pylori*.
Uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*.

B. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (HP) es una bacteria Gram negative que fue aislada en mucosa gástrica por Marshall y Warren en 1983. Hp ha sido descrita como el agente causante de la mayoría de casos de daño en la mucosa gástrica, jugando un papel importante en la evolución de enfermedad gástrica a carcinoma. La infección por HP produce una respuesta inmune del paciente con la producción de anticuerpos específicos IgA, IgA e IgM. Ensayos inmunoenzimáticos son usados en la determinación de pacientes afectados con gastritis o úlceras pépticas producidas por infecciones agudas de cepas virulentas de *Helicobacter pylori*.

Se ha descrito que la presencia de anticuerpos IgA e IgM están correlacionados con fases agudas de la enfermedad, mientras que la presencia de anticuerpos IgG se encuentran a diferentes niveles poco tiempo después de la primera infección, manteniéndose en sangre durante algunos años. ELISA cuantitativos también son usados en el estudio de pacientes con tratamiento de antibióticos, muy útil en el seguimiento de niveles de IgG durante y después del tratamiento farmacéutico.

C. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Las microplacas están recubiertas con antígenos inmunodominantes de *H. pylori* procedentes de cultivos titulares de una cepa virulenta.

En la 1ª incubación, la fase sólida es tratada con muestras diluidas y los anticuerpos anti-HP IgA quedan unidos a los antígenos de la fase sólida.

Después de lavar, los componentes de la muestra que no se hayan unido son eliminados. En la 2ª incubación, los anticuerpos anti-HP IgA unidos son detectados por la adición de anticuerpos anti-IgA humana marcados con peroxidasa (HRP). La enzima queda capturada en la fase sólida y actúa sobre el cromógeno/substrato, la actividad de la enzima genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpo anti-HP IgA presente en la muestra.

La cantidad de IgA presente en la muestra es cuantificada usando una curva estándar calibrada en unidades arbitrarias por mililitro (Uarb/ml).

La neutralización de anticuerpos anti-HP IgG es necesaria para eliminar interferencias en la determinación de IgA. La neutralización se realiza directamente en los pocillos.

D. COMPONENTES

Cada estuche posee los reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLATE

12 tiras x 8 pocillos unidos a antígenos inmunodominantes de HP procedentes de cultivos en tejidos de una cepa virulenta de HP. Las placas están selladas en bolsas que contienen desecantes.

Permitir que las microplacas alcancen la temperatura ambiente antes de abrir; sellar las tiras no usadas en la bolsa con desecantes y conservar a 4°C

2. Curva de Calibración: CAL N° ...

Listo para el uso y codificados con color estándar rangos de curva:

4 ml CAL1 = 0 arbU/ml
4 ml CAL2 = 5 arbU/ml
2 ml CAL3 = 10 arbU/ml
2 ml CAL4 = 20 arbU/ml
2 ml CAL 5 = 50 arbU/ml
4 ml CAL6 = 100 arbU/ml.

Los estándares están calibrados según un interno Gold Standard or IGS ya que no se ha definido uno internacional. Contiene proteínas de suero humano, 2% caseína, 10mM tampón citrato sódico pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Azida sódica y 0.045% ProClin 300 como conservantes. Los estándares están codificados con color azul.

3. Suero Control: CONTROL ...ml

1 vial. Liofilizado.

Contiene proteínas de suero bovino fetal, anticuerpos IgA humanos frente a HP a 20 Uarb/ml±20%, 0.3 mg/ml sulfato de gentamicina y 0.045% ProClin 300 como conservantes.

4. Tampón de lavado concentrado: WASHBUF 20X

1x60ml/botella 20x solución concentrada.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM pH 7.0±0.2, 0.05% Tween 20 y 0.045% ProClin 300.

5. Enzima conjugada: CONJ

1x16ml/vial. Listo para usar y codificada con el color rojo. Contiene anticuerpos policlonales que reconocen IgA humana y están marcados con peroxidasa de rábano, 5% BSA, 10 mM de tampón Tris pH 6.8±0.1, 0.045% ProClin 300 y 0.02% de sulfato de gentamicina como conservantes.

6. Cromogeno/Substrato: SUBS TMB

1x16ml/vial.

Contiene 50 mM tampon citrato-fostato pH 3.5-3.8, 4% dimetilsulfóxido, 0.03% tetra-methyl-benzidina (TMB) y 0.02% peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

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

7. Ácido sulfúrico: H2SO4 0.3 M

1x15ml/vial, contiene solución 0.3 M H₂SO₄.

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

8. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60ml/vial. Contiene 2% caseína, 10 mM tampon citrato sódico pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% azida sódica y 0.045% ProClin 300 como conservantes. Usar para diluir las muestras.

9. Reactivo Neutralizante: SOLN NEUT

1x8ml/vial. Listo para usar. Contiene anticuerpos de cabra anti IgG humana, 2% caseína, 10 mM tampon citrate sódico pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% azida sódica y 0.045% ProClin 300 como conservantes.

10. Sellador adhesivo n°2

11. Libro de instrucciones n°1

E. MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas (1000ul, 100 y 10ul) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para eliminar agentes químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. Reloj con un rango de 60 minutos o más.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA (seco o húmedo) capaz de alcanzar una temperatura de 37°C (+/- 0.5°C).
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de filtros de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Agitador o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El estuche debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar las ropas protectoras adecuadas de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser entrenado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los estuches, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno/ substrato a la luz y también las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el estuche a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar reactivos de diferentes lotes ni tampoco de diferentes estuches.
7. Comprobar que los reactivos son transparentes y no contienen precipitados ni agregados en el momento del uso. En caso contrario, informar al supervisor del laboratorio para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el estuche.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/ plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del estuche usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en el estuche e internamente en los reactivos. Un estudio dirigido a comprobar la actividad de estuches abiertos, no mostró pérdida de actividad en estuches usados hasta 6 veces en un periodo de 3 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.
13. Los desechos producidos durante el uso del estuche deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser inactivados antes de tirar. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del estuche (por ejemplo: puntas usadas en la

manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según las técnicas estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Las muestras deben estar identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Cuando el estuche se emplea para el pesquiasaje en unidades de sangre, se recomienda el uso del código de barras.
3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.

H. PREPARACIÓN DE COMPONENTES Y PRECAUCIONES

Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación. De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas, deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes, se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie de amarillo a verde.

Curva calibración:

Componentes listos para usar. Mezclar cuidadosamente con agitador antes de usar.

Suero control:

Añadir el volumen de agua de ELISA, indicada en la marca, dejar disolver y mezclar con agitador.

Nota: El control después de la disolución no es estable. Almacenar a -20°C en alícuotas.

Tampón de lavado concentrado:

Todo el contenido del tampón concentrado 20x debe diluirse con agua bidestilada y mezclarse suavemente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

Enzima conjugada:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios.

En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Cromogeno/Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios.

Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas.

En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Diluyente de muestras:

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

Reactivo Neutralizante:

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

Ácido Sulfúrico:

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

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

Leyenda:

Indicación de peligro, **Frases H**

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, **Frases P**

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y HERRAMIENTAS USADAS EN COMBINACIÓN CON EL ESTUCHE

1. Las micropipetas deben ser calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (alcohol, lejía 10%, desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%. Deben descontaminarse periódicamente los residuos de los componentes del estuche.
2. El incubador de ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación

con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.

4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de $\pm 5\%$.
5. El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro (620-630nm, obligatorio) para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda $\leq 10\text{nm}$ b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2.0 , c) Linealidad ≥ 2.0 , reproducibilidad $\geq 1\%$. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar la correcta medición de la densidad óptica, según las normas del fabricante.
6. En caso de usar un sistema automatizado de ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos por contaminación de los pocillos adyacentes por muestras fuertemente reactivas. Se recomienda el uso de sistemas automatizados de ELISA cuando el número de muestras para analizar supera las 20-30 unidades por ensayo.
7. El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el estuche, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos.

L. CONTROLES Y OPERACIONES PREVIAS AL ENSAYO

1. Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del estuche (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Compruebe que los componentes líquidos no están contaminados con partículas o agregados visibles.
3. Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico.
4. Compruebe que no han ocurrido rupturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
5. Disolver totalmente el contenido del Suero Control, como se ha descrito anteriormente.
6. Diluir totalmente el tampón de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
7. Dejar los componentes restantes alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
8. Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y cebar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
9. Comprobar que el lector de ELISA esté conectado al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
10. En caso de trabajar automáticamente, conectar el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.

11. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
12. Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
13. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al supervisor.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

El estuche puede ser usado para determinaciones cuantitativas y cualitativas.

M1. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA:

1. Diluir las muestras 1:101 dentro de un apropiado tubo (ejemplo: 1000 µl Diluyente de muestras + 10 µl muestra). No diluir el grupo de Calibración ya que están listos para usarse. Mezclar todos los reactivos líquidos en un agitador y continua como se describe a continuación.
2. Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico. Dejar el primer pocillo A1 y B1 vacío para el blanco.
3. Dispensar 50 µl del Reactivo Neutralizante (SOLN NTR) en todos los pocillos de las muestras. ¡No añadirlo dentro de los pocillos usados para los Calibradores y el Suero Control!

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

4. Dispensar 100 µl de Calibrador y 100 µl de Suero Control por duplicado. Una vez hecho esto, añadir 100 µl de las muestras diluidas en cada uno de los pocillos marcados específicamente.
5. Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C.**

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

6. Lavar la microplaca con el lavador automático dispensando según se indica (sección I.3).
7. Dispensar 100 µL de la Enzima Conjugada en todos los pocillos, excepto en el A1 y B1, y cubrir con el sellador. Compruebe que este reactivo de color rojo ha sido añadido en todos los pocillos excepto el A1.

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

8. Incubar la microplaca **60 min a +37°C.**
9. Lavar los pocillos como en el paso 6.
10. Dispensar 100 µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1 y B1. Incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos.**

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

11. Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 10. La adición de la solución de parada cambia el color del calibrador positivo, el suero control y las muestras positivas de azul a amarillo.
12. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección I.5, con un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del

fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 o B1 o ambos (blanco).

M2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Para realizar una determinación cualitativa, proceder como se describe a continuación:

1. Diluir las muestras 1:101 dentro de un apropiado tubo (ejemplo: 1000 µl Diluyente de muestras + 10 µl muestra). No diluir el Set Calibrador ya que están listos para usarse. Mezclar todos los reactivos líquidos en un agitador y continua como se describe a continuación.
2. Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico. Dejar el primer pocillo (A1) vacío para el blanco.
3. Dispensar 50 µl del Reactivo Neutralizante (SOLN NTR) en todos los pocillos de las muestras. ¡No añadirlo dentro de los pocillos usados para los calibradores!

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

4. Dispensar 100 µl de Calibrador 0Uarb/ml y Calibrador 5Uarb/ml por duplicado y Calibrador 100Uarb/ml en un solo pocillo. Una vez hecho esto, añadir 100 µl de las muestras diluidas en cada uno de los pocillos marcados específicamente.
5. Incubar la microplaca durante **60min a +37°C.**

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

6. Lavar la microplaca con el lavador automático como se indicó previamente (Sección I.3).
7. Dispensar 100 µL de la Enzima Conjugada en todos los pocillos, excepto en el A1 y cubrir con el sellador. Compruebe que este reactivo de color rojo ha sido añadido en todos los pocillos excepto el A1.

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

8. Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C.**
9. Lavar los pocillos como en el paso 6.
10. Dispensar 100 µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el blanco. Incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos.**

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

11. Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 10. La adición de la solución de parada cambia el color de los calibradores positivos, el suero control y las muestras positivas de azul a amarillo.
12. Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección I.5, con un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

Notas importantes:

1. Asegurarse de que no hay impresiones digitales ni polvo en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría

producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO:

Método	Operaciones
Reactivo Neutralizante (sólo para muestras)	50 µl
Calibradores y Control(*)	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Enzima conjugada	100 µl
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3ª incubación	20 min
Temperatura	18°-24°C
Ácido sulfúrico	100 ul
Lectura DO	450nm/620-630 nm

(*) Notas importantes:

- El suero de control (CS) no afecta al cálculo de los resultados de la prueba.
- El suero de control (CS) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado:

Microplaca												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	CAL4	M1									
B	BL	CAL4	M2									
C	CAL1	CAL5	M3									
D	CAL1	CAL5	M4									
E	CAL2	CAL6	M5									
F	CAL2	CAL6	M6									
G	CAL3	SC(*)	M7									
H	CAL3	SC(*)	M8									

Leyenda: BL= Blanco CAL= Calibrador
SC(*)= Suero Control - No obligatorio M= Muestra

A continuación se describe un ejemplo del esquema en un ensayo cualitativo:

Microplaca												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M3	M11									
B	CAL1	M4	M12									
C	CAL1	M5	M13									
D	CAL2	M6	M14									
E	CAL2	M7	M15									
F	CAL6	M8	M16									
G	M1	M9	M17									
H	M2	M10	M18									

Leyenda: BL= Blanco CAL = Calibradores
M= Muestra

O. CONTROL INTERNO DE CALIDAD

Se realiza un grupo de pruebas con los controles cada vez que se usa el estuche para verificar si los valores DO 450nm/620-630nm son los esperados.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Exigencia
Pocillo Blanco	Valor < 0.100 DO 450nm
CAL 1 0 Uarb/ml	Media valor < 0.150 DO 450nm después del blanco Coeficiente de variación < 30%
CAL 2 5 Uarb/ml	DO 450nm > DO 450nm CAL1 + 0.100
CAL 6 100 Uarb/ml	DO 450nm > 1.000

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

En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe:

Problema	Compruebe que
Pocillo blanco > 0.100 DO 450nm	1. La solución Cromogeno/Substrato no se ha contaminado durante el ensayo
CAL 1 0 Uarb/ml > 0.150 DO 450nm después del blanco coeficiente de variación > 30%	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido cebado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el calibrador positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del calibrador negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
CAL 2 5 Uarb/ml DO 450nm < DO 450nm CAL1 + 0.100	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en la distribución (ej. dispensar un calibrador incorrecto). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.
CAL 6 100 Uarb/ml < 1.000 DO 450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en la distribución (ej. dispensar un calibrador incorrecto). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si ocurre alguno de los problemas anteriores, después de la comprobación, informe al supervisor para tomar las medidas pertinentes.

** Notas

Si se ha usado suero de control, comprobar los siguientes datos:

Parámetro	Exigencia
Suero Control	valor medio de DO450nm CAL4 +/-20%

Si los resultados de la prueba no se corresponden con los requisitos indicados anteriormente, proceder del siguiente modo:

Problema	Compruebe que
Suero Control	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente.
Diferente de los valores esperados	2. no se han cometido errores en la distribución (ej. dispensar un calibrador incorrecto).
	3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación.
	4. no ha ocurrido contaminación externa del control.

En cualquier caso, si todos los demás parámetros (blanco, CAL1, CAL2, CAL6) se corresponden con los requisitos establecidos, la prueba puede considerarse válida.

Nota importante:

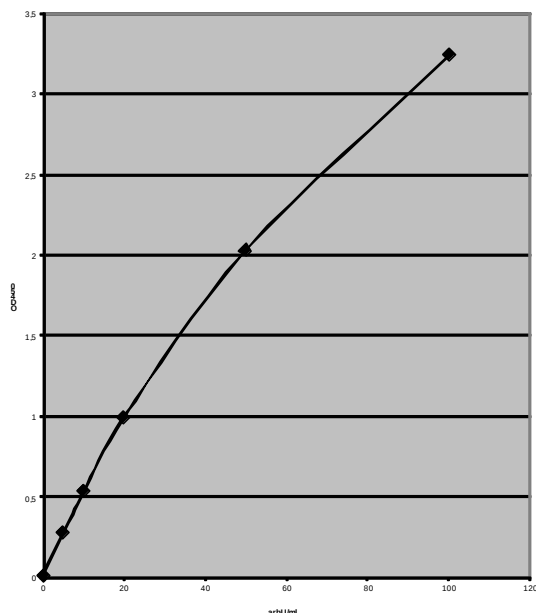
El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 12.

P. RESULTADOS

P.1 Método Cuantitativo

Para la determinación cuantitativa se hace necesario usar un programa adecuado para dibujar una curva de calibrado con los valores obtenidos de la lectura a 450nm/620-630nm. La concentración de anticuerpos anti-*H. Pylori* presente en las muestras se calculará utilizando la curva de calibración.

Un ejemplo de Curva de Calibración se muestra a continuación:



Nota Importante: No usar esta curva de calibración para hacer los cálculos.

P.2 Método Cualitativo

En el método cualitativo, calcula la media de los valores DO 450nm/620-630nm del calibrador 0 y 5 Uarb/ml y comprueba que el ensayo es válido.

Ejemplo de cálculos (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 12).

Nota: Los siguientes datos no deben ser usados en lugar de los datos reales obtenidos.

Calibrador 0 Uarb/ml: 0.020 – 0.024 DO 450nm
Media Valor: 0.022 DO 450nm
Menor que 0.150 – Aceptado

Calibrador 5 Uarb/ml: 0.250 – 0.270 DO 450nm
Media Valor: 0.260 DO 450nm
Mayor que Cal 0 + 0.100 – Aceptado

Calibrador 100 Uarb/ml: 2.045 DO 450nm
Mayor que 1.000 – Aceptado

La DO 450nm/620-630nm del Calibrador 5 Uarb/ml es considerado el valor del corte (cut-off o Co).

La relación entre el valor de DO 450nm/620-630nm de la muestra y la DO450nm/620-630nm del Calibrador 5 Uarb/ml (o M/Co) puede dar información semi-cuantitativa de la cantidad de IgG de la muestra.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Muestras con una concentración menor de 5 Uarb/ml son consideradas negativas para la presencia de anticuerpos anti-*H.pylori* IgA.-4

Muestras con una concentración mayor de 5 Uarb/ml son consideradas positivas para la presencia de anticuerpos anti-*H.pylori* IgA.

Notas importantes:

1. La presencia de anticuerpos anti-*H.pylori* IgA no son suficientes para diagnosticar infección por *Helicobacter pylori*. Otros estudios para for *Helicobacter pylori* (suministrados por Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. con código n° HPAG.CE, HPG.CE y HPM.CE), pueden ser realizados.
2. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del supervisor del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
3. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
4. El diagnóstico debe ser evaluado y comunicado al paciente por un médico calificado.

R. REALIZACIONES CARACTERÍSTICAS

La evaluación de las realizaciones deben ser dirigidas sobre paneles de muestras positivas y negativas en un laboratorio clínico externos con referencia a FDA.

1. Límite de detección

La comunidad Europea no ha definido estándares internacionales para la detección de anticuerpos anti-HP IgA. En su ausencia, un Internal Gold Standard (o IGS), derivado de pacientes con historia de infección por HP, ha sido definido con la finalidad de proporcionar un procedimiento con alta sensibilidad.

2. Especificidad y Sensibilidad Diagnósticas:

Las realizaciones diagnósticas fueron evaluadas en un centro externo de amplia experiencia en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

La **sensibilidad diagnóstica** fue estudiada en un estudio externo en más de 50 muestras, pre-probadas como positivas con la referencia de kits de origen Europeo utilizados en los laboratorios. Muestras positivas fueron tomadas de pacientes con historial clínico de infección por *H. pylori*.

La especificidad diagnóstica fue determinada en un estudio externo en paneles de más de 100 muestras negativas de individuos normales y donantes de sangre, clasificados como negativos con la referencia del kit, incluidas las muestras potencialmente interferentes.

Tanto el plasma, derivado con diferentes técnicas de preparación estándar (citrato, EDTA y heparina) y los sueros se han utilizado para determinar la especificidad.

No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

Además fueron estudiadas 35 muestras de reacciones cruzadas para verificar la ausencia de interferencias en el ensayo de los resultados. No se observó interferencia (100% de especificidad).

También se han analizado muestras congeladas, para verificar si las muestras congeladas interfieren con la realización de la prueba. No se observaron interferencias en el lavado y en las partículas de muestras gratuitas.

La Evaluación externa nos ofreció los siguientes valores:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

3. Reproducibilidad:

Un estudio realizado en tres muestras de diferentes anticuerpos anti-HP IgA reactividad, examinado en 16 replicaciones in 3 tiras separadas ha mostrado valores CV% entre 7-18% dependiendo de la lectura de la DO 450nm/620-630nm.

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

S. LIMITACIONES

Falsos positivos han sido estudiados con menos del 2% de la población normal.

Las muestras que después de ser descongeladas presentan partículas de fibrina o partículas agregadas, generan algunos resultados falsos positivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lazzaroni M. et al.. Medicina (1989), 9, 9-18.
2. Vaira D. et al.. Federazione Medica XLI (1988), 7, 54+9-555.
3. Oderda G. Et al.. The Lancet (1989), vol.6, 7, 358-360.
4. Loffeld H. et al.. The Lancet (1989) vol.6, 10, 554-556
5. Vaira D. et al.. British Medical Journal (1988), vol.9, 43, 374-375.
6. Oderda G. et a.. Gut (1989), vol. 30, 7, 912-916.
7. Vaira D. et al.. Ital.J.Gastroenterol. (1988), 20, 299-304.
8. Vaira D. et al.. Current Opinion in Gastroenterology (1989), 5, 817-823.
9. 5, 817-823.

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado conforme a la norma ISO 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

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



HP IgG

**Enzyme ImmunoAssay (ELISA)
for the quantitative/qualitative
determination of IgG antibodies to
Helicobacter pylori
in human serum and plasma**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

HP IgG

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the quantitative/qualitative determination of IgG antibodies to *Helicobacter pylori* in human plasma and sera. The product is intended for the follow-up of patients showing gastrointestinal pathologies potentially correlated to HP infection.

For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

Helicobacter pylori (HP) is a Gram negative bacterium, firstly isolated in gastric mucosa by Marshall and Warren in 1983.

HP has been recognized to be the agent responsible of most of cases of gastric mucosal damage and to play a role in the evolution of gastric diseases to carcinoma.

HP causes an immunological response during infection and specific antibodies of the different classes of IgG, IgA and IgM are produced by the patient.

ELISA are currently used to screen patients affected by gastritis or peptic ulcers for acute active infection due to some *Helicobacter pylori* virulent strains.

In particular the presence of IgA and IgM antibodies is reported to be correlated to the acute phase of illness, while IgG antibodies become present at different titers shortly after primary infections and last in blood for many years.

Quantitative ELISA are also used in the follow-up of patients undergoing antibiotic therapy, useful in monitoring IgG titer variations during and after the pharmaceutical treatment

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with H.pylori immunodominant antigens derived from tissue culture of a virulent strain.

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

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

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

IgG in the sample may therefore be quantitated by means of a standard curve calibrated in arbitrary units per milliliter (arbU/ml) as no international standard is available.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 microwells coated with HP specific immunodominant antigens derived from tissue culture of a virulent strain. Plates are sealed into a bag with desiccant.

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

2. Calibration Curve: CAL N° ...

Ready to use and color coded standard curve ranging:

4 ml CAL1 = 0 arbU/ml
4 ml CAL2 = 5 arbU/ml
2 ml CAL3 = 10 arbU/ml
2 ml CAL4 = 20 arbU/ml
2 ml CAL 5 = 50 arbU/ml
4 ml CAL6 = 100 arbU/ml.

Standards are calibrated against an internal Gold Standard or IGS as no international one is defined.

Contains human serum proteins, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. Standards are blue colored.

3. Control Serum: CONTROL ...ml

1 vial. Lyophilized. It contains fetal bovine serum proteins, human IgG antibodies to HP at about 20 arbU/ml±20%, 0.3 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

4. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle. 20x concentrated solution. Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

5. Enzyme conjugate : CONJ

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

6. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

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

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

7. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vial contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

8. Specimen Diluent: DILSPE

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

9. Plate sealing foils n°2

10. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained

in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

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

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.

3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.

4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection.

Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for several months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.

5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of conservation.

In this case call Dia.Pro's customer service.

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

Calibration Curve

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

Control Serum

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilised powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex.

Note: The control after dissolution is not stable. Store frozen in aliquots at -20°C.

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

Sample Diluent

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

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/- 0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).
5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.
An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of ±5%.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0; (c) linearity to ≥ 2.0; repeatability ≥ 1%. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the section "Internal quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles

used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.

7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dissolve the content of the Control Serum as reported.
6. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
7. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
8. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
9. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
10. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
11. Check that the micropipettes are set to the required volume.
12. Check that all the other equipment is available and ready to use.
13. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

The kit may be used for quantitative and qualitative determinations as well.

M1. QUANTITATIVE DETERMINATION:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the A1 and B1 empty for the operation of blanking.
3. Dispense 100 µl of Calibrators and 100 µl Control Serum in duplicate. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
4. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- Wash the microplate with an automatic as reported previously (section I.3).
- Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except A1+B1 blanking wells, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1 and B1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
- Wash microwells as in step 5.
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank wells A1 and B1 included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µl Sulphuric Acid to stop the enzymatic reaction into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1 or B1 or both (mandatory).

M2. QUALITATIVE DETERMINATION

If only a qualitative determination is required, proceed as described below:

- Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
- Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.
- Dispense 100 µl of Calibrator 0 arbU/ml and Calibrator 5 arbU/ml in duplicate and Calibrator 100 arbU/ml in single. Then dispense 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section I.3).
- Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the A1 well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
- Wash microwells as in step 5.
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1 or B1 or both (mandatory).

General Important notes:

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

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Calibrators & Control(*)	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H2O2	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm / 620-630nm

(*) Important Notes:

- The Control Serum (CS) it does not affect the test's results calculation.
- The Control Serum (CS) used only if a laboratory internal quality control is required by the Management.

An example of dispensation scheme for Quantitative Analysis is reported below:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S 1									
B	BLK	CAL4	S 2									
C	CAL1	CAL5	S 3									
D	CAL1	CAL5	S 4									
E	CAL2	CAL6	S 5									
F	CAL2	CAL6	S 6									
G	CAL3	CS(*)	S 7									
H	CAL3	CS(*)	S 8									

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrator
CS = Control Serum- Not mandatory S = Sample

An example of dispensation scheme in qualitative assays is reported below:

Microplate												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 3	S 11									
B	CAL1	S 4	S 12									
C	CAL1	S 5	S 13									
D	CAL2	S 6	S 14									
E	CAL2	S 7	S 15									
F	CAL6	S 8	S 16									
G	S1	S 9	S 17									
H	S2	S 10	S 18									

Legenda: BLK = Blank
S = Sample
CAL = Calibrators

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls and the calibrator any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as expected and required by the IVDD directive 98/79/EC.

Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
CAL 1 0 arbU/ml	< 0.150 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
CAL 2 5 arbU/ml	OD450nm > OD450nm CAL1 + 0.100
CAL 6 100 arbU/ml	OD450nm > 1.000

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

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

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not got contaminated during the assay
CAL 1 0 arbU/ml > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive calibrator instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative calibrator or of their wells has occurred due spills of positive samples or the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

CAL 2 5 arbU/ml OD450nm < OD450nm CAL1 + 0.100	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (ex.: dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
CAL 6 100 arbU/ml < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

** Note:

If Control Serum has used, verify the following data:

Check	Requirements
Control Serum	Mean OD450nm CAL4 +/-20%

If the results of the test doesn't match the requirements stated above, operate as follows:

Problem	Check
Control Serum Different from expected value	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the control has occurred.

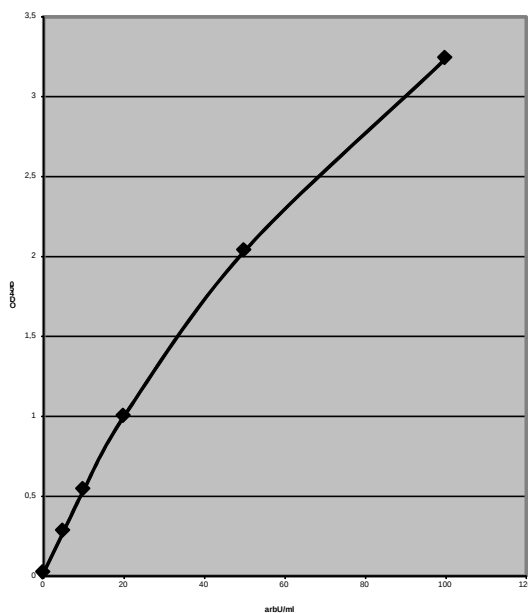
Anyway, if all other parameters (Blank, CAL1, CAL2, CAL 6), match the established requirements, the test may be considered valid.

P. RESULTS

P.1 Quantitative method

If the test turns out to be valid, use for the quantitative method an approved curve fitting program to draw the calibration curve from the values obtained by reading at 450nm (4-parameters interpolation is suggested). Then on the calibration curve calculate the concentration of anti H.pylori IgG antibody in samples.

An example of Calibration curve is reported below.



Important Note:

Do not use the calibration curve above to make calculations.

P.2 Qualitative method

In the qualitative method, calculate the mean OD450nm values for the Calibrators 0 and 5 arbU/ml and then check that the assay is valid.

Example of calculation:

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

Calibrator 0 arbU/ml: 0.020 – 0.024 OD450nm
Mean Value: 0.022 OD450nm
Lower than 0.150 – Accepted

Calibrator 5 arbU/ml: 0.250 – 0.270 OD450nm
Mean Value: 0.260 OD450nm
Higher than Cal 0 + 0.100 – Accepted

Calibrator 100 arbU/ml: 2.045 OD450nm
Higher than 1.000 – Accepted

The OD450nm of the Calibrator 5 arbU/ml is considered the cut-off (or Co) of the system.

The ratio between the OD450nm value of the sample and the OD450nm of the Calibrator 5 arbU/ml (or S/Co) can provide a semi-quantitative estimation of the content of specific IgG in the sample.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Samples with a concentration lower than 5 arbU/ml are considered negative for anti H.pylori IgG antibody. Samples with a concentration higher than 5 arbU/ml are considered positive for anti H.pylori IgG antibody.

Important notes:

1. H.pylori IgG results alone are not enough to provide a clear diagnosis of Helicobacter pylori infection. Other tests for Helicobacter pylori (supplied by Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. at code n° HPAG.CE, HPA.CE and HPM.CE), should be carried out.

2. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
3. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
4. Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted on panels of positive and negative samples in an external clinical laboratory with reference to a FDA approved reference kit.

1. Limit of detection

No international standard for HP IgG Antibody detection has been defined so far by the European Community. In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient with an history of past mononucleosis infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The diagnostic performances were evaluated in a performance evaluation study conducted in an external center, with excellent experience in the diagnosis of infectious diseases.

The diagnostic sensitivity was studied on more than 50 samples, pre-tested positive with the reference kit of European origin in use at the laboratory. Positive samples were collected from patients with a clinical history of H.pylori infection.

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

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

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

The Performance Evaluation provided the following values :

Sensitivity	> 98 %
Specificity	> 98 %

3. Reproducibility:

A study conducted on three samples of different HP IgG reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs has shown CV% values ranging 2-18% depending on the OD450nm readings.

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

S. LIMITATIONS

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

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

REFERENCES

1. Lazzaroni M. et al.. Medicina (1989), 9, 9-18.
2. Vaira D. et al.. Federazione Medica XLI (1988), 7, 549-555.
3. Oderda G. Et al.. The Lancet (1989), vol.6, 7, 358-360.
4. Loffeld H. et al.. The Lancet (1989) vol.6, 10, 554-556
5. Vaira D. et al.. British Medical Journal (1988), vol.9, 43, 374-375.
6. Oderda G. et a.. Gut (1989), vol. 30, 7, 912-916.
7. Vaira D. et al.. Ital.J.Gastroenterol. (1988), 20, 299-304.
8. Vaira D. et al.. Current Opinion in Gastroenterology (1989), 5, 817-823.

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System in compliance with ISO 13485 rule. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:

Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.

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



HP IgM

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for
the determination of IgM antibodies
to *Helicobacter pylori*
in human serum and plasma

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

HP IgM

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the determination of IgM antibodies to *Helicobacter pylori* in human plasma and sera. For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

Helicobacter pylori (HP) is a Gram negative bacterium, firstly isolated in gastric mucosa by Marshall and Warren in 1983. Hp has been recognized to be the agent responsible of most of cases of gastric mucosal damage and to play a role in the evolution of gastric diseases to carcinoma.

Hp causes an immunological response during infection and specific antibodies of the different classes of IgG, IgA and IgM are produced by the patient.

ELISA are currently used to screen patients affected by gastritis or peptic ulcers for acute active infection due to some *Helicobacter pylori* virulent strains.

In particular the presence of IgA and IgM antibodies is reported to be correlated to the acute phase of illness, while IgG antibodies become present at different titers shortly after primary infections and last in blood for many years.

Quantitative ELISA are also used in the follow-up of patients undergoing antibiotic therapy, useful in monitoring IgG titer variations during and after the pharmaceutical treatment

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with *H.pylori* immunodominant antigens derived from tissue culture of a virulent strain.

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

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

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

The presence of IgM in the sample may therefore be determined by means of a cut-off value able to discriminate between negative and positive samples.

Neutralization of IgG anti-HP, carried out directly in the well, is performed in the assay in order to block interferences due to this class of antibodies in the determination of IgM.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 microwells coated with HP specific immunodominant antigens derived from tissue culture of a virulent strain. Plates are sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

2. Negative Control: CONTROL -

1x4.0 ml/vial. Ready to use. It contains, human IgM antibodies negative to HP, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/- 0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

The Negative Control is pale yellow color coded.

3. Positive Control: CONTROL +

1x4.0 ml/vial. Ready to use. It contains high titer human IgM antibodies positive to HP, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

The Positive Control is green yellow color coded.

4. Calibrator: CAL ...

n° 1 vial. Lyophilized reagent to be dissolved with EIA grade water as reported in the label. It contains bovine serum proteins, low titer human IgM antibodies to HP, 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

Note: The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label .

5. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle20x concentrated solution.

Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

6. Enzyme conjugate : CONJ

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

7. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

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

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

8. Sulphuric Acid: H2SO4 0.3 M

1x15ml/vialIt contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

9. Specimen Diluent: DILSPE

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

10. Neutralizing Reagent: SOLN NEUT

1x8ml/vial. It contains goat anti hlgG, 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

11. Plate sealing foils n°2

12. Package insert n°1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.
4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant is not turned to dark green, indicating a defect of manufacturing. In this case call Dia.Pro's customer service. Unused strips have to be placed back into the aluminium pouch, in presence of desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°..8°C. When opened the first time, residual strips are stable till the indicator of humidity inside the desiccant bag turns from yellow to green.

Negative Control

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

Positive Control

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

Calibrator

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilized powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex.

Note: *The dissolved calibrator is not stable. Store it frozen in aliquots at -20°C.*

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: *Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2..8° C.*

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

Sample Diluent

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

Neutralizing Reagent

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

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/-2%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at +37°C (tolerance of +/-0.5°C) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).
5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.
An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of ±5%.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter (620-630nm,

mandatory) for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth ≤ 10 nm; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0; (c) linearity to ≥ 2.0; repeatability ≥ 1%. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer 's instructions.

6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dissolve the content of the Calibrator as reported.
6. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
7. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
8. Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
9. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
10. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
11. Check that the micropipettes are set to the required volume.
12. Check that all the other equipment is available and ready to use.
13. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

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

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Controls/Calibrator as they are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave A1 well empty for the operation of blanking.
3. Dispense 50 µl Neutralizing Reagent in all the wells, except A1 used for blanking operations and in the wells used for the Controls and the Calibrator.

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

4. Dispense 100 µl of Negative Control in triplicate, 100 µl of Positive Control in single, 100 µl of Calibrator in duplicate and 100 µl of diluted samples in each properly identified well.
5. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

6. Wash the microplate with an automatic as reported previously (section I.3).
7. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the A1 well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

8. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
9. Wash microwells as in step 6.
10. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

11. Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
12. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

1. Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.

2. Reading has to be carried out just after the addition of the Stop Solution and anyway not any longer than 20 minutes after its addition. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to high background.

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Neutralizing Reagent (only for samples)	50 µl
Calibrator(*) & Controls	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H2O2	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm/620-630nm

(*) Important Notes:

- The Calibrator (CAL) does not affect the Cut Off calculation, therefore it does not affect the test's results calculation.
- The Calibrator (CAL) used only if a laboratory internal quality control is required by the Management.

An example of dispensation scheme is reported in the table below:

Microplate												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL(*)	S6										
F	CAL(*)	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control
PC = Positive Control S = Sample
CAL(*) = Calibrator – Not Mandatory

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as expected and required by the IVDD directive 98/79/EC. Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
Negative Control	< 0.150 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
Positive Control	OD450nm > 0.500

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

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

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not got contaminated during the assay
Negative Control > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of a positive control instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative control or of their wells has occurred due spills of positive samples or the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
Positive Control < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong control) ; 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

** Note:

If the Calibrator has used, verify the following data:

Check	Requirements
Calibrator	S/Co > 1.0

If the results of the test doesn't match the requirements stated above, operate as follows:

Problem	Check
Calibrator S/Co < 1.0	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong control instead); 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.

Anyway, if all other parameters (Blank, Negative Control, Positive Control), match the established requirements, the test may be considered valid.

P. RESULTS

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

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

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

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as a ratio of the sample OD450nm/620-630nm value (S) and the cut-off value (Co), or S/Co, according to the following table:

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

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

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

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

Important notes:

1. *H.pylori IgM results alone are not enough to provide a clear diagnosis of Helicobacter pylori infection. Other tests for Helicobacter pylori (supplied by Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. at code n° HPAG.CE, HPA.CE and HPG.CE), should be carried out.*
2. *Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.*
3. *When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.*
4. *Diagnosis has to be done and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.*

An example of calculation is reported below.

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

Negative Control: 0.100 – 0.120 – 0.080 OD450nm
Mean Value: 0.100 OD450nm
Lower than 0.150 – Accepted

Positive Control: 1.000 OD450nm
Higher than 0.500 – Accepted

$$\text{Cut-Off} = 0.100 + 0.250 = 0.350$$

Calibrator: 0.500 – 0.540 OD450nm
Mean value: 0.520 OD450nm
S/Co higher than 1.0 – Accepted

Sample 1: 0.080 OD450nm
Sample 2: 1.800 OD450nm
Sample 1 S/Co < 1.0 = negative
Sample 2 S/Co > 1.2 = positive

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what reported in the Essential Requirements of the Directive 98/79/EC.

1. Limit of detection

No international standard for HP IgM Antibody detection has been defined so far by the European Community. In its absence, an Internal Gold Standard (or IGS), derived from a patient with an history of past mononucleosis infection, has been defined in order to provide the device with a constant and excellent sensitivity.

2. Diagnostic Sensitivity and Specificity:

The diagnostic performances were evaluated in a performance evaluation study conducted in an external center, with excellent experience in the diagnosis of infectious diseases.

The diagnostic sensitivity was studied on more than 50 samples, pre-tested positive with the reference kit of European origin in use at the laboratory. Positive samples were collected from patients with a clinical history of H.pylori acute infection.

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

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

Frozen specimens have also been tested to check whether samples freezing interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

The Performance Evaluation provided the following values:

Sensitivity	> 98 %
Specificity	> 98 %

3. Reproducibility:

It has been calculated on three samples examined in replicates in different runs. CV% values obtained from a study conducted on three samples of different HP IgM reactivity, examined in 16 replicates in three separate runs ranged between 4-15%, depending on the OD450nm/620-630nm reading.

The variability observed did not result in sample misclassification.

S. LIMITATIONS

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

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

REFERENCES

1. Lazzaroni M. et al.. Medicina (1989), 9, 9-18.
2. Vaira D. et al.. Federazione Medica XLI (1988), 7, 549-555.
3. Oderda G. Et al.. The Lancet (1989), vol.6, 7, 358-360.
4. Loffeld H. et al.. The Lancet (1989) vol.6, 10, 554-556
5. Vaira D. et al.. British Medical Journal (1988), vol.9, 43, 374-375.
6. Oderda G. et a.. Gut (1989), vol. 30, 7, 912-916.
7. Vaira D. et al.. Ital.J.Gastroenterol. (1988), 20, 299-304.
8. Vaira D. et al.. Current Opinion in Gastroenterology (1989), 5, 817-823.

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System in compliance with ISO 13485 rule. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:

Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.

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



HP IgM

Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para la
determinación de anticuerpos IgM frente a
Helicobacter pylori
en suero y plasma humano

Uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*



DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

HP IgM

A. OBJETIVO DEL ESTUCHE

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cuantitativa/cualitativa de anticuerpos IgM frente a *Helicobacter pylori* en suero y plasma humano.

Uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*.

B. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (HP) es una bacteria Gram negative que fue aislada en mucosa gástrica por Marshall y Warren en 1983.

Hp ha sido descrita como el agente causante de la mayoría de casos de daño en la mucosa gástrica, jugando un papel importante en la evolución de enfermedad gástrica a carcinoma. La infección por HP produce una respuesta inmune del paciente con la producción de anticuerpos específicos IgA, IgA e IgM.

Ensayos inmunoenzimáticos son usados en la determinación de pacientes afectados con gastritis o úlceras pépticas producidas por infecciones agudas de cepas virulentas de *Helicobacter pylori*.

Se ha descrito que la presencia de anticuerpos IgA e IgM están correlacionados con fases agudas de la enfermedad, mientras que la presencia de anticuerpos IgG se encuentran a diferentes niveles poco tiempo después de la primera infección, manteniéndose en sangre durante algunos años.

ELISA cuantitativos también son usados en el estudio de pacientes con tratamiento de antibióticos, muy útil en el seguimiento de niveles de IgG durante y después del tratamiento farmacéutico.

C. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Las microplacas están recubiertas con antígenos inmunodominantes de *H. pylori* procedentes de cultivos titulares de una cepa virulenta.

En la 1ª incubación, la fase sólida es tratada con muestras diluidas y los anticuerpos anti-HP IgG quedan unidos a los antígenos de la fase sólida.

Después de lavar, los componentes de la muestra que no se hayan unido son eliminados. En la 2ª incubación, los anticuerpos anti-HP IgM unidos son detectados por la adición de anticuerpos anti-IgM humana marcados con peroxidasa (HRP).

La enzima queda capturada en la fase sólida y actúa sobre el cromógeno/substrato, la actividad de la enzima genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpo anti-HP IgM presente en la muestra.

La cantidad de IgM presente en la muestra es determinada usando la media del valor de corte (cut-off o co) que permite discriminar entre muestras positivas y negativas.

La neutralización de anticuerpos anti-HP IgG es necesaria para eliminar interferencias en la determinación de IgM. La neutralización se realiza directamente en los pocillos.

D. COMPONENTES

Cada estuche posee los reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLATE

12 tiras x 8 pocillos unidos a antígenos inmunodominantes de HP procedentes de cultivos en tejidos de una cepa virulenta de HP. Las placas están selladas en bolsas que contienen desecantes.

Permitir que las microplacas alcancen la temperatura ambiente antes de abrir; sellar las tiras no usadas en la bolsa con desecantes y conservar a 4°C

2. Control Negativo: CONTROL -

1x4.0ml/vial.

Listo para el uso. Contiene, anticuerpos humanos IgM negativos para HP, 2% de caseína, 10mM de tampón Citrato Sódico pH

6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Azida sódica y 0.045% ProClin 300, como conservantes.

El control negativo está codificado con el color amarillo.

3. Control Positivo: CONTROL +

1x4.0ml/vial.

Listo para el uso. Contiene, altos niveles de anticuerpos humanos IgM positivos para HP, 2% caseína, 10mM de tampón Citrato Sódico pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Azida sódica y 0.045% ProClin 300, como conservantes.

El control positivo está codificado en el color verde-amarillo oscuro.

4. Calibrador: CAL ...

Vial nº1. 1 vial. Liofilizado para ser disuelto en agua EIA, como queda marcado en el recipiente. Contiene proteínas de suero bovino, bajos niveles de anticuerpos humanos IgM frente a HP, 0,2mg/ml sulfato de gentamicina y 0.045% ProClin 300, como conservantes.

Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del vial puede variar de un lote a otro. Usar el volumen correcto marcado.

5. Tampón de lavado concentrado: WASHBUF 20X

1x60ml/botella 20x solución concentrada.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 y 0.045% ProClin 300.

6. Enzima conjugada : CONJ

1x16ml/vial. Listo para usar y codificada con el color rojo. Contiene anticuerpos policlonales que reconocen IgM humana y están marcados con peroxidasa de rábano, 5% BSA, 10 mM de tampón Tris pH 6.8+/-0.1, 0.045% ProClin 300 y 0.02% de sulfato de gentamicina como conservantes.

7. Cromogeno/Substrato: SUBS TMB

1x16ml/vial.

Contiene 50 mM tampón citrato-fosfato pH 3.5-3.8, 4% dimetilsulfóxido, 0.03% tetra-metil-benzidina (TMB) y 0.02% peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

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

8. Ácido sulfúrico: H2SO4 0.3 M

1x15ml/vial, contiene solución 0.3 M H₂SO₄.

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

9. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60ml/vial. Contiene 2% caseína, 10 mM tampón citrato sódico pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% azida sódica y 0.045% ProClin 300 como conservantes. Usar para diluir las muestras.

10. Reactivo Neutralizante: SOLN NEUT

1x8ml/vial. Contiene anticuerpos de cabra anti IgG humana, 2% caseína, 10 mM tampón citrato sódico pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% azida sódica y 0.045% ProClin 300 como conservantes.

11. Sellador adhesivo nº2

12. Libro de instrucciones nº1

E. MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas (1000ul, 100 y 10ul) y puntas de plástico desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para eliminar agentes químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. Reloj con un rango de 60 minutos o más.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA (seco o húmedo) capaz de alcanzar una temperatura de 37°C (+/- 0.5°C).

6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de filtros de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Agitador o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El estuche debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar las ropas protectoras adecuadas de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser entrenado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los estuches, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del cromógeno/ substrato a la luz y también las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el estuche a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar reactivos de diferentes lotes ni tampoco de diferentes estuches.
7. Comprobar que los reactivos son transparentes y no contienen precipitados ni agregados en el momento del uso. En caso contrario, informar al supervisor del laboratorio para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el estuche.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/ plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del estuche usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables
10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en el estuche e internamente en los reactivos. Un estudio dirigido a comprobar la actividad de estuches abiertos, no mostró pérdida de actividad en estuches usados hasta 6 veces en un periodo de 6 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.
13. Los desechos producidos durante el uso del estuche deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser inactivados antes de tirar. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en

contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.

15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del estuche (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según las técnicas estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Las muestras deben estar identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Cuando el estuche se emplea para el pesquiasaje en unidades de sangre, se recomienda el uso del código de barras.
3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.

H. PREPARACIÓN DE COMPONENTES Y PRECAUCIONES

Microplaca:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación. De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas, deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes, se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie de amarillo a verde.

Control Negativo

Listo para usar. Mezclar cuidadosamente con agitador antes de usar.

Control Positivo

Listo para usar. Mezclar cuidadosamente con agitador antes de usar.

Calibrador

Añadir el volumen de agua de ELISA, indicada en la marca, dejar disolver y mezclar con agitador.

Nota: El calibrador disuelto no es estable. Almacenar a -20°C en alícuotas.

Tampón de lavado concentrado:

Todo el contenido del tampón concentrado 20x debe diluirse con agua bidestilada y mezclarse suavemente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

Enzima conjugada:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios.

En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Cromogeno/Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios.

Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas.

En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Diluyente de muestras:

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

Reactivo Neutralizante:

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

Ácido Sulfúrico:

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

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

Leyenda:

Indicación de peligro, Frases H

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, Frases P

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y HERRAMIENTAS USADAS EN COMBINACIÓN CON EL ESTUCHE

1. Las micropipetas deben ser calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (alcohol, lejía 10%, desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%. Deben descontaminarse periódicamente los residuos de los componentes del estuche.
2. El incubador de ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las

instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.

4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de ±5%.
5. El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro (620-630nm, obligatorio) para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda ≤ 10nm b) Rango de absorbancia de 0 a ≥2.0, c) Linealidad ≥2.0, reproducibilidad ≥1%. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar la correcta medición de la densidad óptica, según las normas del fabricante.
6. En caso de usar un sistema automatizado de ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en la sección "Control interno de calidad". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos por contaminación de los pocillos adyacentes por muestras fuertemente reactivas. Se recomienda el uso de sistemas automatizados de ELISA cuando el número de muestras para analizar supera las 20-30 unidades por ensayo.
7. El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el estuche, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos.

L. CONTROLES Y OPERACIONES PREVIAS AL ENSAYO

1. Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del estuche (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Compruebe que los componentes líquidos no están contaminados con partículas o agregados visibles.
3. Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico.
4. Compruebe que no han ocurrido rupturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
5. Disolver totalmente el contenido del Calibrador, como se ha descrito anteriormente.
6. Diluir totalmente el tampón de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
7. Dejar los componentes restantes alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
8. Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y cebear el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.

- Comprobar que el lector de ELISA esté conectado al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
- En caso de trabajar automáticamente, conectar el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
- Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
- Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
- En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al supervisor.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

- Diluir las muestras 1:101 dentro de un apropiado tubo (ejemplo: 1000 µl Diluyente de muestras + 10 µl muestra). No diluir el Control/Calibración ya que están listos para usarse. Mezclar todos los reactivos líquidos en un agitador y continua como se describe a continuación.
- Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico. Dejar el primer pocillo A1 vacío para el blanco.
- Dispensar 50 µl del Reactivo Neutralizante (SOLN NTR) en todos los pocillos de las muestras, excepto en A1. ¡No añadirlo dentro de los pocillos usados para los Calibradores y los Controles!

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

- Dispensar 100 µl de Control Negativo por triplicado, Calibrador por duplicado y 100 µl de Control Positivo en un solo pocillo y 100 µl de muestras diluidas en cada uno de los pocillos marcados específicamente.
- Incubar la microplaca durante **60 min a +37°C**.

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

- Lavar la microplaca con el lavador automático dispensando según se indica (section I.3).
- Dispensar 100 µl de la Enzima Conjugada en todos los pocillos, excepto en el A1, y cubrir con el sellador. Compruebe que este reactivo de color rojo ha sido añadido en todos los pocillos excepto el A1.

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

- Incubar la microplaca **60 min a +37°C**.
- Lavar los pocillos como en el paso 6.
- Dispensar 100 µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1. Incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) durante 20 minutos**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

- Dispensar 100 µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 10. La adición de la solución de parada cambia el color del calibrador positivo, el suero control y las muestras positivas de amarillo a azul.
- Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección I.5, con un filtro de

450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

Notas importantes:

- Asegurarse de que no hay impresiones digitales ni polvo en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
- La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO:

Método	Operaciones
Reactivo Neutralizante (sólo para muestras)	50 µl
Calibrador(*) y Controles	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Enzime conjugada	100 µl
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
TMB/H2O2	100 µl
3ª incubación	20 min
Temperatura	18-24°C
Ácido sulfúrico	100 µl
Lectura DO	450nm/620-630nm

(*) Notas importantes:

- El calibrador (CAL) no afecta al cálculo del valor de corte y, por lo tanto, no afecta al cálculo de los resultados de la prueba.
- El calibrador (CAL) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado:

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

Legenda: BL = Blanco CN = Control Negativo
CAL(*) = Calibrador - No obligatorio CP = Control Positivo
M = Muestra

O. CONTROL INTERNO DE CALIDAD

Se realiza un grupo de pruebas con los controles cada vez que se usa el estuche para verificar si los valores DO 450nm son los esperados.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Exigencia
Pocillo blanco	Valor < 0.100 DO 450nm
Control Negativo	Valor Medio < 0.150 DO 450nm después del blanco Coeficiente de variación < 30%
Control Positivo	DO 450nm > 0.500

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pase a la siguiente sección.
En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe:

Problema	Compruebe que
Pocillo Blanco > 0.100 DO 450nm	1. La solución Cromogeno/Substrato no se ha contaminado durante el ensayo
Control Negativo > 0.150 DO 450nm después del blanco coeficiente de variación > 30%	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido cebado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del control negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
Control Positivo < 1.000 OD450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en la distribución (ej. dispensar un control equivocado). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si ocurre alguno de los problemas anteriores, después de la comprobación, informe al supervisor para tomar las medidas pertinentes.

** Nota:

Si se ha usado el Calibrador, comprobar los siguientes datos:

Parámetro	Exigencia
Calibrador	S/Co > 1.0

Si los resultados de la prueba no se corresponden con los requisitos indicados anteriormente, proceder del siguiente modo:

Problema	Compruebe que
Calibrador S/Co < 1.0	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en la distribución (ej. dispensar un control equivocado). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.

En cualquier caso, si todos los demás parámetros (blanco, control negativo, control positivo) se corresponden con los requisitos establecidos, la prueba puede considerarse válida.

P. RESULTADOS

Los resultados se calculan con la media de la DO 450nm/650-630nm del control Negativo y por medio de un valor de corte (cut-off) hallado con la siguiente fórmula:

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

Nota Importante: Cuando el cálculo de los resultados se halla mediante el sistema operativo de un equipo de ELISA automático, asegurarse de que la formulación usada para el cálculo del valor de corte, y para la interpretación de los resultados sea correcta.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación de los resultados se realiza mediante la razón entre las DO a 450nm/620-630nm de las muestras y el Valor de corte (M/Co).

Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

M/Co	Interpretación
< 1.0	Negativo
1.0 – 1.2	Equívoco
> 1.2	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no ha desarrollado anticuerpos IgM frente a *H.pylori*.

Cualquier paciente, cuya muestra resulte equívoca debe someterse a una nueva prueba con una segunda muestra de sangre colectada 1 ó 2 semanas después de la inicial.

Un resultado positivo es indicativo de infección por *H.pylori*. y por consiguiente el paciente debe ser tratado adecuadamente.

Notas importantes:

- La presencia de anticuerpos anti-*H.pylori* IgA no son suficientes para diagnosticar infección por *Helicobacter pylori*. Otros estudios para for *Helicobacter pylori* (suministrados por Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. con código n° HPAG.CE, HPA.CE y HPG.CE), pueden ser realizados.
- La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del supervisor del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
- Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
- El diagnóstico debe ser evaluado y comunicado al paciente por un médico calificado.

A continuación, un ejemplo de los cálculos a realizar:

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

Control Negativo: 0.100 – 0.120 – 0.080 DO 450nm
Media del Valor: 0.100 DO 450nm
Menor que 0.150 – Aceptado

Control Positivo: 1.000 DO 450nm
Mayor que 0.500 – Aceptado

Valor de Corte o Cut-Off = 0.100+0.250 = 0.350

Calibrador: 0.500 – 0.540 DO 450nm
Meida del Valor: 0.520 DO 450nm
S/Co mayor que 1.0 – Aceptado

Muestra 1: 0.080 DO 450nm
Muestra 2: 1.800 DO 450nm
Muestra 1 S/Co < 1.0 = Negativo
Muestra 2 S/Co > 1.2 =Positivo

R. REALIZACIONES CARATERÍSTICAS

La evaluación de las realizaciones debe ser dirigida de acuerdo a lo establecido en Essential Requirements of the Directive 98/79/EC.

1. Límite de detección

La comunidad Europea no ha definido estándares internacionales para la detección de anticuerpos anti-HP IgM. En su ausencia, un Internal Gold Standard (o IGS), derivado de pacientes con historia de infección por mononucleosis infecciosa, ha sido definido con la finalidad de proporcionar un procedimiento con alta sensibilidad.

2. Especificidad y Sensibilidad Diagnósticas:

Las realizaciones diagnósticas fueron evaluadas en un centro externo de amplia experiencia en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

La sensibilidad diagnóstica fue estudiada en más de 50 muestras, pre-probadas como positivas. Muestras positivas fueron tomadas de pacientes con historial clínico de infección por *H. pylori*.

La especificidad diagnóstica fue determinada en paneles de más de 100 muestras negativas de donantes normales, clasificados como negativos incluyendo especímenes que pudieran interferir potencialmente.

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

Por último se analizaron muestras congeladas, para determinar posibles interferencias debidas a la toma de muestra y al almacenamiento. No se observaron interferencias.

La Evaluación de las Realizaciones nos ofreció los siguientes valores:

Sensibilidad	> 98 %
Especificidad	> 98 %

3. Reproducibilidad:

Ha sido calculada en tres muestras determinadas en diferentes filas. Valores de CV% de un estudio sobre tres muestras de diferentes reactividad IgM anti-HP, realizadas en tres filas separadas, muestra resultados entre 4-15%, dependiendo de la lectura de la DO 450nm/620-630nm.

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

S. LIMITACIONES

Falsos positivos han sido estudiados con menos del 2% de la población normal.

Las muestras que después de ser descongeladas presentan partículas de fibrina o partículas agregadas, generan algunos resultados falsos positivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lazzaroni M. et al.. Medicina (1989), 9, 9-18.
2. Vaira D. et al.. Federazione Medica XLI (1988), 7, 549-555.
3. Oderda G. Et al.. The Lancet (1989), vol.6, 7, 358-360.
4. Loffeld H. et al.. The Lancet (1989) vol.6, 10, 554-556
5. Vaira D. et al.. British Medical Journal (1988), vol.9, 43, 374-375.
6. Oderda G. et a.. Gut (1989), vol. 30, 7, 912-916.
7. Vaira D. et al.. Ital.J.Gastroenterol. (1988), 20, 299-304.
8. Vaira D. et al.. Current Opinion in Gastroenterology (1989), 5, 817-823.

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado conforme a la norma ISO 13485. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:

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

