

# MONOSPOT<sup>®</sup>

**REF** 776060

 **20 tests**

**IVD** For in vitro diagnostic use only

ENGLISH p 2

A qualitative and semiquantitative differential slide test for the Heterophile antibody of infectious mononucleosis

ITALIANO p 5

Test qualitativo e semiquantitativo di emoagglutinazione differenziale per la ricerca degli anticorpi eterofili legati alla Mononucleosi Infettiva

FRANÇAIS p 8

Détection qualitative et semi-quantitative des anticorps hétérophiles de la mononucléose infectieuse dans le sérum et le plasma humains.

ESPAÑOL p 12

Test cualitativo y semicuantitativo para la detección de los Anticuerpos Heterófilos del Mononucleosis Infecciosa

DEUTSCH p 15

Test zum Nachweis von Heteriphilen Anticörpern bei Infektiöser Mononukleose



### SUMMARY AND EXPLANATION

Certain, apparently unique heterophile antibodies appear in the serum of patients during the infectious mononucleosis process. Measurements of these antibodies are performed by indirect procedures. One type of heterophile antibody was originally described by Forssman and bears his name. The Forssman antibody is one of a group of heterophile antibodies which has the ability to react with antigens apparently unrelated to those that stimulated their production. [1] The heterophile antibody associated with infectious mononucleosis is not the same as the Forssman antibody, since the IM antigen is a distinct entity. [2] A differential absorption of the patient's serum or plasma is therefore necessary to distinguish the specific heterophile antibody of infectious mononucleosis from other heterophile antibodies. [3]

The basic principle of the absorption steps in MONOSPOT are comparable to those originally suggested by Davidsohn in his sheep agglutinin test. [1,2] For detection of the specific heterophile antibody associated with IM, MONOSPOT utilises fresh stabilised horse erythrocytes (red blood cells) which have been shown to be more sensitive than sheep erythrocytes or formalinised horse erythrocytes. [4] Infectious diseases such as influenza, rubella, hepatitis and others may cause clinical symptoms that mimic infectious mononucleosis and present problems in diagnosis. [5] The final diagnosis of infectious mononucleosis depends upon clinical, haematological and serologic findings. [6]

Although usually seen in adolescents and young adults, infectious mononucleosis has been reported in children as young as one and one-half years, [7] and also in patients over the age of 60. A few documented examples of recurrence of infectious mononucleosis have been reported, however, they have been extremely rare. [8,9] It has been shown that a non-specific respiratory infection may cause a significant heterophile antibody response in patients who have had infectious mononucleosis, months or years previously. [9]

The specific heterophile antibody of IM is usually demonstrable by the sixth to tenth day after the onset of illness. It is at its highest level during the second to third week, and may persist for at least six weeks. [10] The level of antibody activity is not correlated with the severity of the disease or the degree of lymphocytosis. [11]

### PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

The procedure is based on agglutination of horse red blood cells by the heterophile antibody of infectious mononucleosis. Since horse red blood cells contain both Forssman and IM antigens, a differential absorption of the patient's serum is necessary to distinguish the specific heterophile antibody of IM from those of the Forssman type. This is accomplished by absorbing the serum or plasma with both guinea pig kidney and beef erythrocyte stroma. Guinea pig kidney contains only the Forssman antigen while beef erythrocytes contain only the antigen associated with infectious mononucleosis. Therefore, guinea pig kidney will absorb only heterophile antibodies of the Forssman type while beef erythrocytes will absorb only the heterophile antibody of infectious mononucleosis. Agglutination of horse red blood cells by the absorbed patient specimen is indicative of a positive reaction for the IM heterophile antibody (see Results).

### REAGENTS

1. **Reagent I** (Guinea Pig Antigen) is suspension of guinea pig kidney antigen preserved with sodium azide (1%).
2. **Reagent II** (Beef Erythrocyte Stroma) is a suspension of beef erythrocyte stroma antigen preserved with sodium azide (1%).
3. **Indicator Cells** (Horse Erythrocytes) is a suspension of stabilised horse red blood cells preserved with chloramphenicol (1:3,000), neomycin sulfate (1:10,000) and gentamycin (1:20,000).
4. **Positive Control Serum** (Human) is human serum containing the heterophile antibody of infectious mononucleosis, preserved with sodium azide (0.1%).
5. **Negative Control Serum** (Human) is human serum not containing the heterophile antibody of infectious mononucleosis, preserved with sodium azide (0.1%).

For in vitro diagnostic use.

CAUTION: All blood products should be treated as potentially infectious. Source material from which this product was derived was found negative when tested in accordance with current FDA required tests. No known test methods can offer assurance that products derived from human blood will not transmit infectious agents.

### REAGENT PREPARATION

The reagents are ready to use. Prior to use, however, Reagent I, Reagent II and Indicator Cells should be shaken well to provide a homogeneous suspension.

### STORAGE INSTRUCTIONS

When properly stored, the kit is stable through the expiration date printed on the package label. The expiration date of the kit corresponds to the shortest dated reagent. Contents of the entire kit should be discarded on the expiration date. Reagents must be stored at 2 to 8°C when not in use. DO NOT FREEZE REAGENTS. Deterioration of Indicator Cells will be signified by hemolysis. Proper reactivity may be verified by a positive control test (see Procedure).

## **SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION**

No special preparation of the patient is required prior to specimen collection. Serum, or plasma mixed with anticoagulants including EDTA, sodium oxalate, potassium oxalate, sodium citrate, ACD solution or heparin, may be used. Inactivation of the serum is not necessary, however, inactivated serum may be used. Serum or plasma samples should be clear and particle-free. The heterophile antibody of infectious mononucleosis is relatively stable and uncontaminated specimens or serum or plasma may be stored at 2 to 8°C for several days following collection before testing. If prolonged storage is desired, the patient specimen should be frozen.

A sample for testing with MONOSPOT may be obtained from finger stick blood using the procedure outlined below:

1. Using standard heparinized or non-heparinized capillary pipettes (75 mm length, 1.1 mm to 1.2 mm inside diameter, 85µL volume) obtain a minimum of four capillary pipettes full of blood from a finger puncture.
2. Prepare capillary pipettes and centrifuge according to standard procedure for hematocrit testing.
3. Break capillary pipettes at interface between serum or plasma and cells and use serum or plasma from two capillary pipettes as patient sample for each side of the slide according to the directions for use. Sufficient patient specimen for the test (0.05 mL for each side of the slide) is recovered by this procedure if a hematocrit of less than 50% is obtained. If the hematocrit should be greater than 50%, additional capillary pipettes may be necessary to yield the required specimen volume.

## **PROCEDURE**

### **Materials provided**

Reagent I (Guinea Pig Kidney) 1 mL

Reagent II (Beef Erythrocyte Stroma) 1 mL

Indicator Cells (Horse Erythrocytes) 20 tests

Positive Control Serum (Human) 0.5 mL

Negative Control Serum (Human) 0.5 mL

Glass Slide - Microcapillary Pipettes, 20 mcl capacity, for delivery of Indicator Cells - Rubber Bulbs for use with Microcapillary Pipettes - Plastic Pipettes for delivery of serum or plasma samples - Wooden Applicators for mixing.

All materials necessary to perform the tests are included in the package - no additional material is needed.

### **Directions for use – Qualitative method**

1. Place the slide on a flat surface under a direct light source.
2. Invert the vial of Indicator Cells several times to uniformly suspend the cells. Using one of the disposable microcapillary pipettes provided, deliver 10 mcl of Indicator Cells to one corner of both squares on the slide.  
To use the disposable microcapillary pipettes:
  - a. Insert the end of the pipette marked with a heavy black line one-quarter inch into the neck of the rubber bulb.
  - b. Hold the rubber bulb between the thumb and third finger.
  - c. Tilt the vial of Indicator Cells, insert the pipette, and allow the pipette to fill by capillary action to the top mark (20 mcl). Do not draw cells into the bulb.
  - d. To deliver 10 mcl of Indicator Cells to the slide, place the index finger over the hole in the top of the bulb and squeeze gently until the level of cells in the pipette reaches the first mark. Touch pipette tip to a corner of square "I" to release the cells.
  - e. Deliver the remaining 10 mcl of Indicator cells from the pipette to a corner of square "II".
3. Place one drop of thoroughly mixed Reagent I in the center of square "I".
4. Place one drop of thoroughly mixed Reagent II in the center of square "II".
5. Using a disposable plastic pipette, add one drop of the serum or plasma being tested to the center of each square on the slide.
6. Avoiding the Indicator Cells, mix Reagent I and Reagent II with the serum or plasma in each square at least ten times using a clean wooden applicator for each square. Then, using no more than ten stirring motions, blend in the Indicator Cells over the entire surface of each square. Start a timer upon completion of the final mixing.
7. DO NOT PICK UP OR MOVE THE SLIDE DURING THE REACTION PERIOD.
8. Observe for agglutination for no longer than one minute after final mixing.

Both Positive and Negative Control Serum are provided in each package. These control sera should be used to check the reagents upon arrival in the laboratory and periodically during the dating period.

### **RESULTS - Qualitative method**

Proper performance of the test will indicate the presence or absence of the heterophile antibody of infectious mononucleosis by the presence or absence of agglutination, as indicated below.

#### **POSITIVE TEST**

If the agglutination pattern is stronger on the left side of the slide ( Square I), the test is positive.

#### **NEGATIVE TEST**

If the agglutination pattern is stronger on the right side of the slide ( Square II), the test is negative.

If no agglutination appears on the either square of the slide ( I and II), or if agglutination is equal on both squares of the slide ( I and II), the test is negative.

Agglutination which appears after the one-minute reading time, or which appears when the slide is moved or rocked, is not to be interpreted as a positive result for the heterophile antibody of infectious mononucleosis.

A positive test result is indicative of the heterophile antibody specific for infectious mononucleosis. A titration procedure, as described below, may be performed to provide a semi-quantitative indication of the level of infectious mononucleosis heterophile antibody.

**TITRATION PROCEDURE - Directions for use – Semi-quantitative method**

1. Prepare the following dilutions of serum known to be positive for the heterophile antibody of infectious mononucleosis.

TUBE	DILUTION	COMPOSITION
1	1:2	0.5 mL of patients serum + 0.5 mL physiological saline; mix
2	1:4	0.5 mL of tube 1 + 0.5 mL physiological saline; mix
3	1:8	0.5 mL of tube 2 + 0.5 mL physiological saline; mix
4	1:16	0.5 mL of tube 3 + 0.5 mL physiological saline; mix
5	1:32	0.5 mL of tube 4 + 0.5 mL physiological saline; mix

2. Place a titration slide on a flat surface under a direct light source.
3. Invert the vial of Indicator Cells several times to uniformly suspend the cells. Using one of the disposable microcapillary pipettes provided, deliver 10 µl of Indicator Cells to one corner of each square.
4. Place one drop of thoroughly mixed Reagent I in the center of each of the five squares.
5. Using a disposable plastic pipette, place one drop of each of the dilutions under test in the center of its corresponding square ( Tube 1 to square 1 , etc.).
6. Avoiding the Indicator Cells, mix the reagent and diluted specimen in each square at least ten times with a clean wooden applicator. Then, using no more than ten stirring motions, blend in the Indicator Cells over the entire surface of each square. Start a timer upon completion of the final mixing.
7. DO NOT PICK UP OR MOVE SLIDE DURING THE REACTION PERIOD.
8. Observe for agglutination for no longer than one minute after final mixing.

**RESULTS Semi-quantitative method**

1. The highest dilution in which visible agglutination occurs is the end point. (If agglutination is present in all dilution, extend doubling dilutions from tube 5 and repeat the procedure as outlined above.)
2. Record the titration value obtained. The titer with MONOSPOT cannot be compared with titration values obtained with other slide or tube test procedures since there are significant variations in sensitivity. However, the relative magnitude of titers performed on specimens with different techniques is proportional to the concentration of IM heterophile antibody present.
3. Although the titration value is not indicative of the severity of the disease, sequential testing of the patient with MONOSPOT may provide information of value to the clinician.

**LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

To obtain accurate results, only clear, particle-free serum or plasma samples should be used. False positive results with MONOSPOT have been reported.[12-14] Since the clinical symptoms of IM are similar to many other diseases, it is often difficult to disprove the theoretical possibility of a concomitant infection.[15] The simultaneous occurrence of infectious mononucleosis and hepatitis has been reported.[16] A result which may be interpreted as false positive may possibly be due to residual infectious mononucleosis antibody present after clinical symptoms have subsided.[5,10] Seronegative infectious mononucleosis has also been reported.[5] Because of a delayed heterophile antibody response, it is possible that clinical and haematological symptoms of IM will appear before serologic confirmation is possible. [17]

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

When the test with MONOSPOT is performed in accordance with the directions for use, accuracy greater than 99% is obtainable.[18-22] The result must be combined with clinical and haematological features for diagnosis of infectious mononucleosis. MONOSPOT has been shown to be highly specific for the heterophile antibody of infectious mononucleosis through the use of differential absorption.[2,23] MONOSPOT utilises fresh, stabilised horse red blood cells, which have been shown to be more sensitive than sheep red blood cells or formalinised horse red blood cells.[6,23-25] These performance characteristics were gathered from a large number of papers which have appeared in the scientific literature, in addition to testing performed by the manufacturer.

Monospot	Infectious Mononucleosis [26]		
	Pos	Neg	Total
Pos	94	2	96
Neg	6	118	104
Total	100	120	220

Sensitivity = 94/100 x 100% = 94% - Specificity = 118/120 x 100% = 98%  
 VPP = 97.9% - VPN = 95.1% - Accuracy = 96.3%

**SPIEGAZIONE**

Durante la fase acuta della Mononucleosi Infettiva (MI) nel siero dei pazienti compaiono anticorpi apparentemente unici, detti anticorpi eterofili, che vengono evidenziati mediante tests indiretti.

Un tipo di anticorpi eterofili fu descritto per la prima volta da Forssman e pertanto porta il suo nome. Gli anticorpi di tipo Forssman fanno parte di un gruppo di anticorpi eterofili che è in grado di reagire con antigeni apparentemente non collegati a quelli che ne hanno stimolato la produzione [1]. Gli anticorpi eterofili legati alla Mononucleosi Infettiva differiscono da quelli di tipo Forssman in quanto l'antigene legato alla MI rappresenta un'entità diversa [2].

Per questo motivo è necessario procedere ad un adsorbimento differenziale del siero o del plasma del paziente per differenziare gli anticorpi eterofili legati alla MI dagli anticorpi eterofili di altro tipo [3]. Il principio su cui si basa l'adsorbimento preliminare previsto nella metodica del MONOSPOT è comparabile a quello originariamente consigliato da Davidsohn nel suo test per la ricerca delle agglutinine anti-eritrociti di pecora [1,2]. Per la rilevazione della presenza di anticorpi eterofili legati alla MI il test MONOSPOT utilizza eritrociti freschi di cavallo, che si sono dimostrati più sensibili rispetto agli eritrociti di pecora o agli eritrociti di cavallo conservati in formalina [4].

Altre malattie infettive, quali influenza, rosolia ed epatite, possono causare sintomi clinici molto simili a quelli della MI e rappresentare un problema di diagnostica differenziale [5]. La diagnosi definitiva di MI è basata sull'esame di parametri clinici, ematologici e sierologici [6].

Sebbene sia più frequente negli adolescenti e nei giovani adulti, la MI è stata segnalata anche in bambini al di sotto dei due anni di età [7] ed in anziani al di sopra dei 60 anni. Sono stati descritti anche alcuni casi di recidive, anche se con frequenza estremamente bassa [8,9]. E' stato inoltre dimostrato che certe infezioni polmonari aspecifiche possono causare un aumento di anticorpi eterofili in pazienti che sono stati affetti da MI anche in tempi relativamente lontani [9].

La presenza di anticorpi eterofili legati alla MI è normalmente rilevabile a partire dal sesto-decimo giorno successivo alla comparsa dei sintomi clinici: essi raggiungono il livello massimo durante la seconda-terza settimana di malattia e possono mantenersi a concentrazioni rilevabili per almeno sei settimane [10]. Il livello di anticorpi non dipende dalla gravità della malattia o dal grado di linfocitosi [11].

**PRINCIPIO DEL TEST**

Il test si basa sulla capacità degli anticorpi eterofili legati alla MI di agglutinare gli eritrociti di cavallo. Poiché questi ultimi presentano sia gli antigeni di tipo Forssman sia quelli della MI, è necessario procedere ad un adsorbimento differenziale del siero per distinguere tra anticorpi eterofili legati alla MI e di tipo Forssman. Ciò viene ottenuto adsorbendo il siero o il plasma con estratto di rene di cavia e con stroma di eritrociti di bue: l'estratto di rene di cavia contiene solo l'antigene di tipo Forssman, mentre lo stroma di eritrociti di bue contiene solo l'antigene collegato alla MI. Per cui, l'estratto di rene di cavia adsorbirà solo gli anticorpi eterofili di tipo Forssman, mentre lo stroma di eritrociti di bue legherà solo gli anticorpi eterofili legati alla MI. L'eventuale agglutinazione degli eritrociti di cavallo da parte di un siero o di un plasma così trattato indica la presenza di anticorpi eterofili legati alla MI (vedere la Sezione Risultati).

**REAGENTI FORNITI**

- 1. Reagente I** (Estratto di rene di cavia): sospensione di estratto di rene di cavia contenente sodio azide (1%) come conservante.
- 2. Reagente II** (Stroma di eritrociti di bue): sospensione di estratto di stroma di eritrociti di bue contenente sodio azide (1%) come conservante.
- 3. Sistema indicatore** (Eritrociti di cavallo): sospensione di eritrociti di cavallo stabilizzati contenente cloramfenicolo (1:3000) e neomicina solfato (1:20000) come conservanti.
- 4. Siero di controllo positivo** (Umano): siero umano contenente anticorpi eterofili legati alla MI e sodio azide (0.1%) come conservante.
- 5. Siero di controllo negativo** (Umano): siero umano non contenente anticorpi eterofili legati alla MI. Contiene sodio azide (0.1%) come conservante.

Per uso diagnostico *in vitro*.

**ATTENZIONE:** Tutti gli emoderivati devono essere trattati come campioni potenzialmente infettivi. I campioni utilizzati per la preparazione di questi reagenti sono risultati negativi ai test per la ricerca di HBsAg e HIV Ab, in ottemperanza alla vigente regolamentazione americana stabilita dall'FDA. Tuttavia, non esiste attualmente alcun test che sia in grado di escludere con assoluta certezza che il sangue umano ed i suoi derivati non sia in grado di trasmettere agenti infettivi.

**PREPARAZIONE DEI REAGENTI**

Tutti i reagenti sono pronti all'uso. Tuttavia, i flaconcini contenenti i Reagenti 1 e 2, nonché il Sistema indicatore devono essere agitati prima dell'uso, per ottenere una sospensione omogenea.

## CONSERVAZIONE

Se opportunamente conservato il kit è stabile fino alla data indicata sull'etichetta. La data di scadenza del kit corrisponde a quella del reagente a scadenza più breve: tutto il kit deve essere scartato dopo tale data. I reagenti devono essere conservati a 2°-8°C: NON CONGELARE. Il deterioramento del sistema indicatore è indicato dall'emolisi degli eritrociti; tuttavia esso potrebbe ancora funzionare, per cui se ne può controllare l'efficienza mediante l'utilizzo del controllo positivo (vedi Metodica).

## RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Il campione di sangue viene prelevato mediante tecniche standard. Per il test si possono utilizzare sia il siero sia il plasma raccolto con anticoagulanti quali EDTA, ossalato di sodio, ossalato di potassio, citrato di sodio, soluzione ACD o eparina. Non è necessario inattivare il siero, tuttavia è possibile utilizzare sieri inattivati. I campioni di siero o di plasma devono essere limpidi e privi di particelle. Gli anticorpi eterofili legati alla MI sono relativamente stabili, per cui i campioni sterili di sangue, siero o plasma possono essere conservati a 2°-8°C fino a 72 ore: se il test non può essere eseguito entro tale termine, si consiglia di congelare il siero o il plasma.

Con il MONOSPOT si può utilizzare anche un campione prelevato mediante puntura del polpastrello, seguendo le seguenti istruzioni:

1. Utilizzando pipette capillari standard eparinate o no (lunghezza 75 mm, diametro interno 1.1-1.2 mm, volume 85 µl), riempire di sangue un minimo di quattro pipette capillari, dopo aver punto il polpastrello.
2. Preparare i capillari e centrifugarli seguendo le procedure standard previste per l'esecuzione dell'ematocrito.
3. Rompere i capillari in corrispondenza dell'interfaccia tra il siero o plasma e le cellule ed utilizzare come campione il materiale di due capillari per ciascun lato della lastrina, seguendo la metodica descritta più avanti. Con questo metodo si può ottenere abbastanza siero o plasma per l'esecuzione del test (0.05 ml per ciascun lato della lastrina) se il valore dell'ematocrito è inferiore a 50%. Se tale valore risulta superiore a 50% è necessario prelevare altri capillari di sangue per ottenere sufficiente materiale per il test.

## METODICA

### Materiali forniti

Reagente I (Estratto di rene di cavia) 1 ml

Reagente II (Stroma di eritrociti di bue) 1 ml

Sistema indicatore (Eritrociti di cavallo) 20 tests

Siero di controllo positivo (Umano) 0.5 ml

Siero di controllo negativo (Umano) 0.5 ml

Lastrina di vetro - Pipette microcapillari (capacità 20 µl, da utilizzare con il Sistema indicatore) - Pompette di gomma da utilizzare con i capillari - Pipette di plastica da utilizzare con i campioni di siero o plasma - Bastoncini di legno.

Tutti i materiali necessari all'esecuzione del test sono inclusi nel kit - non servono altri materiali.

### Metodo qualitativo

1. Mettere la lastrina su una superficie orizzontale, sotto una luce diretta.
2. Risospendere con cura il Sistema Indicatore invertendo più volte il flaconcino fino ad ottenere una sospensione omogenea. Usando una delle pipette microcapillari fornite, distribuire 10 µl di Sistema Indicatore in un angolo di entrambi i riquadri della lastrina.  
Per utilizzare le pipette microcapillari monouso:
  - a. Inserire l'estremità del capillare marcata con il segno nero più spesso nella pompetta di gomma.
  - b. Tenere il bulbo della pompetta tra pollice e medio.
  - c. Inclinare il flacone del Sistema indicatore, introdurre il capillare e lasciare che esso si riempia per capillarità fino alla seconda tacca (20 µl). Non aspirare eritrociti all'interno del bulbo.
  - d. Per distribuire 10 µl di Sistema indicatore sulla lastrina, mettere la punta del dito indice sul foro al centro del bulbo della pompetta e premere delicatamente finché il livello di eritrociti raggiunge la prima tacca. Depositare la goccia di eritrociti in un angolo del riquadro I toccando la superficie della lastrina con la punta del capillare.
  - e. Distribuire i 10 µl di Sistema indicatore rimasti nel capillare in un angolo del riquadro II della lastrina.
3. Distribuire una goccia di Reagente I al centro del riquadro I della lastrina, dopo averlo mescolato bene.
4. Distribuire una goccia di Reagente II al centro del riquadro II della lastrina, dopo averlo mescolato bene.
5. Utilizzando una delle pipette monouso di plastica fornite con il kit, aggiungere una goccia del campione di siero o plasma da esaminare ad entrambi i riquadri.
6. Evitando di toccare la goccia di Sistema indicatore, mescolare i Reagenti I e II con il siero o plasma in ciascun riquadro con almeno dieci movimenti circolari, utilizzando un bastoncino di legno pulito. Quindi, utilizzando meno di dieci movimenti circolari, mescolare il Sistema indicatore distribuendolo sull'intera superficie dei riquadri. Far partire il timer dopo aver completato quest'ultima operazione.
7. **NON SOLLEVARE O MUOVERE LA LASTRINA DURANTE IL TEMPO DI REAZIONE.**
8. Osservare la reazione per un minuto per rilevare un'eventuale agglutinazione.

In ciascun kit vengono forniti un Siero di controllo positivo ed uno negativo: tali reagenti devono essere utilizzati al ricevimento del kit, per controllarne il corretto funzionamento.

## RISULTATI - Metodo qualitativo

Il corretto funzionamento del test indica la presenza o l'assenza degli anticorpi eterofili legati alla mononucleosi infettiva mediante presenza o assenza di agglutinazione, come indicato di seguito.

#### **RISULTATO POSITIVO**

Se la reazione di agglutinazione è **più marcata** nella parte **sinistra** della lastrina (Riquadro I), il test è **positivo**.

#### **RISULTATO NEGATIVO**

Se la reazione di agglutinazione è **più marcata** nella parte **destra** della lastrina (Riquadro II), il test è **negativo**.

Se non compare alcuna agglutinazione in nessuno dei due riquadri (I e II), oppure se l'agglutinazione è uguale in entrambi i riquadri (I e II), il test è negativo.

Eventuali agglutinazioni che compaiono dopo più di un minuto, oppure se la lastrina viene mossa o agitata, non devono essere interpretate come positive per la presenza di anticorpi eterofili legati alla MI.

Un test positivo indica la presenza di anticorpi eterofili legati alla MI: una titolazione del siero o plasma può essere eseguita mediante la seguente metodica, per fornire un'indicazione semiquantitativa del livello di anticorpi eterofili legati alla MI.

#### **TITOLAZIONE DEL SIERO O PLASMA - Metodo semiquantitativo**

1. Preparare le seguenti diluizioni partendo da un siero o plasma risultato positivo al test qualitativo per la presenza di anticorpi eterofili legati alla MI.

<b>Provetta</b>	<b>Diluizione</b>	<b>Composizione</b>
1	1:2	0.5 ml di campione +0.5 ml di sol. fisiologica
2	1:4	0.5 ml dalla provetta 1 +0.5 ml di sol. fisiologica
3	1:8	0.5 ml dalla provetta 2 +0.5 ml di sol. fisiologica
4	1:16	0.5 ml dalla provetta 3 +0.5 ml di sol. fisiologica
5	1:32	0.5 ml dalla provetta 4 +0.5 ml di sol. fisiologica

2. Porre la lastrina su una superficie orizzontale e sotto una fonte di luce diretta.
3. Risospendere uniformemente il Sistema indicatore capovolgendo più volte il flaconcino. Usando una delle pipette microcapillari fornite, distribuire 10 µl di eritrociti in un angolo di entrambi i riquadri.
4. Distribuire una goccia di Reagente I ben mescolato al centro di ciascuno dei cinque riquadri.
5. Usando una pipetta monouso, distribuire una goccia di ciascuna diluizione al centro del corrispondente riquadro (ad es., provetta 1 nel riquadro 1, ecc.).
6. Evitando di toccare la goccia di Sistema indicatore, mescolare il Reagente I e le diluizioni del campione con almeno dieci movimenti circolari, utilizzando un bastoncino di legno pulito. Quindi, utilizzando meno di dieci movimenti circolari, mescolare il Sistema indicatore distribuendolo sull'intera superficie dei riquadri. Far partire il timer dopo aver completato quest'ultima operazione.
7. **NON SOLLEVARE O MUOVERE LA LASTRINA DURANTE IL TEMPO DI REAZIONE.**
8. Osservare la reazione per un minuto per rilevare un'eventuale agglutinazione.

#### **RISULTATI - Metodo semiquantitativo**

1. Viene considerata indicativa del titolo anticorpale la più alta diluizione che presenta agglutinazione visibile (se è presente agglutinazione in tutte le diluizioni, è consigliabile preparare ulteriori diluizioni al raddoppio partendo dalla provetta 5 e ripetere il test).
2. Refertare il valore di titolo ottenuto. I titoli ottenuti con il MONOSPOT non possono essere paragonati a quelli ottenuti con altri metodi di agglutinazione su vetrino o in provetta a causa delle notevoli differenze di sensibilità. Tuttavia, il valore del titolo rilevato in un siero mediante tecniche differenti è in ogni caso proporzionale alla quantità di anticorpi eterofili legati alla MI presenti.
3. Sebbene il titolo non sia strettamente collegato alla gravità della malattia, la ripetizione del test MONOSPOT sui pazienti positivi ad intervalli regolari può fornire informazioni interessanti al medico curante.

#### **LIMITAZIONI DEL TEST**

Per ottenere risultati accurati bisogna utilizzare esclusivamente campioni di siero o plasma che si presentano limpidi, senza segni di contaminazione. In letteratura sono stati segnalati alcuni risultati falsi positivi con il MONOSPOT [12-14]. Poiché la sintomatologia clinica della MI è simile a quella di altre malattie è assai difficile escludere la possibilità di infezioni concomitanti [15]: ad esempio, è stata segnalata la contemporanea presenza di MI ed epatite in alcuni pazienti [16]. Un risultato apparentemente falso positivo potrebbe essere dovuto ad un residuo di anticorpi eterofili legati alla MI anche in tempi successivi alla scomparsa dei sintomi clinici [5,10].

Sono stati segnalati anche casi di sieronegatività in corso di MI [5]. A causa del ritardo nella comparsa degli anticorpi eterofili, è possibile che i tipici quadri clinici ed ematologici compaiano prima di poter avere una conferma sierologica [17].

#### **PRESTAZIONI DEL TEST**

Quando il test MONOSPOT viene eseguito seguendo correttamente la metodica è possibile ottenere valori di accuratezza pari al 99% [18-22]. Come per tutti i test diagnostici, anche in questo caso il risultato deve essere valutato alla luce del quadro clinico ed ematologico del paziente, per giungere alla diagnosi della MI. Il test MONOSPOT si è dimostrato estremamente specifico per gli anticorpi eterofili legati alla MI grazie al passaggio iniziale di adsorbimento differenziale [2,23]. Il MONOSPOT utilizza eritrociti freschi di cavallo, che si sono dimostrati più sensibili rispetto agli eritrociti di pecora o a quelli di cavallo conservati in formalina [6,23-25].

Questi dati riguardanti le prestazioni del test sono stati desunti da un gran numero di lavori scientifici che sono stati pubblicati su varie riviste e dai dati tests eseguiti dalla Ditta Produttrice.

Monospot	Mononucleosi Infettiva [26]		
	Pos	Neg	Total
Pos	94	2	96
Neg	6	118	104
Total	100	120	220

Sensibilità =  $94/100 \times 100\% = 94\%$  - Specificità =  $118/120 \times 100\% = 98\%$   
VPP = 97.9% - VPN = 95.1% - Accuratezza = 96.3%

FRANÇAIS

**MONOSPOT™** Référence 776060 – 20 tests  
**Détection qualitative et semi-quantitative des anticorps hétérophiles de la mononucléose infectieuse dans le sérum et le plasma humains.**

#### BUT DE LA METHODE

Le coffret MONOSPOT est basé sur une méthode qualitative et semi-quantitative de détection sur lame des anticorps hétérophiles de la mononucléose infectieuse.

#### INTRODUCTION

Certains anticorps hétérophiles apparaissent dans le sérum des patients au cours du processus infectieux de la mononucléose. Les dosages de ces anticorps ont été d'abord réalisés par des procédures indirectes.

Un type d'anticorps hétérophiles a été originellement décrit par Forssman et porte son nom. L'anticorps Forssman appartient à un groupe d'anticorps hétérophiles qui a la possibilité de réagir avec des antigènes qui sont apparemment sans relation avec les antigènes stimulant sa production (1). Les anticorps hétérophiles associés à la mononucléose infectieuse ne sont pas les anticorps de Forssman, mais une entité distincte (2).

L'absorption différentielle préalable du sérum ou du plasma des patients est nécessaire pour permettre de différencier les anticorps hétérophiles spécifiques de la mononucléose, des autres anticorps hétérophiles (3).

Le principe des différentes étapes du test MONOSPOT est comparable à celui suggéré par Davidsohn dans son test d'agglutinine de mouton (1, 2). Pour permettre la détection des anticorps hétérophiles de la mononucléose infectieuse, le test MONOSPOT utilise des érythrocytes (globules rouges) frais stabilisés de cheval, qui sont plus sensibles que les érythrocytes de mouton ou les érythrocytes formolés de cheval (4).

Les maladies infectieuses telles que la grippe, la rubéole, l'hépatite ou autres peuvent produire des symptômes similaires à une infection mononucléosique, et posent des problèmes de diagnostic (5). Le diagnostic final de la mononucléose dépend des résultats cliniques, hématologiques et sérologiques (6).

Bien que habituellement retrouvée chez les adolescents et les jeunes adultes, la mononucléose infectieuse est également observable chez les jeunes enfants de 12 à 18 mois (7), et chez des patients ayant dépassé 60 ans. Quelques exemples de surinfection à la mononucléose ont également été reportés, bien que ces cas restent extrêmement rares (8, 9). On a pu démontrer qu'une infection respiratoire non spécifique peut donner une réponse significative en anticorps hétérophiles chez les patients qui ont présenté une mononucléose infectieuse des mois ou des années auparavant (9).

L'anticorps hétérophile spécifique de la mononucléose infectieuse est habituellement identifiable aux alentours du sixième ou du dixième jour qui suit le début de la maladie. Le taux d'anticorps le plus élevé se situe entre la deuxième et la troisième semaine, et peut persister pendant au moins six semaines (10). Le taux d'anticorps n'est pas représentatif de la sévérité de l'infection, ou du degré de lymphocytose (11).

#### PRINCIPE DU TEST

Le test MONOSPOT est basé sur l'agglutination des globules rouges de cheval, par les anticorps hétérophiles spécifiques de la mononucléose infectieuse (MNI).

Les globules rouges de cheval contiennent des antigènes de type Forssman, et les antigènes de la MNI. Une absorption différentielle des sérums des patients est nécessaire afin de différencier les anticorps hétérophiles spécifiques de la MNI, des anticorps de type Forssman.

Une première absorption du sérum ou du plasma du patient est donc effectuée, avec de l'extrait de rein de cobaye et une suspension de membranes d'hématie de bœuf. Le rein de cobaye contient seulement des antigènes de type Forssman, tandis que les membranes d'érythrocytes de bœuf contiennent exclusivement les antigènes associés à la MNI. Les anticorps de type Forssman seront absorbés par les extraits de rein de cobaye, alors que les anticorps hétérophiles de la MNI seront absorbés par les membranes d'hématies de bœuf.

Une agglutination des globules rouges de cheval par les échantillons des patients préalablement absorbés indique une réaction positive : l'échantillon contient des anticorps hétérophiles spécifiques de la MNI.

#### MATERIEL FOURNI

Chaque boîte de 20 tests contient :

**Réactif I (1 ml)** : suspension antigénique de rein de cobaye dans un tampon. *Attention : contient de l'azide de sodium 1%.*

**Réactif II (1 ml)** : suspension antigénique de membrane d'hématie de bœuf dans un tampon. *Attention : contient de l'azide de sodium 1%.*

**Cellules Indicatrices (1 ml)** : suspension de globules rouges stabilisés de cheval, conservés dans du chloramphénicol (1:3000), du sulfate de néomycine (1:10 000) et de la gentamicine (1:20 000).

**Contrôle Positif (0.5 ml)** : sérum humain contenant des anticorps hétérophiles de la mononucléose infectieuse. *Attention : contient de l'azide de sodium 1%.*

**Contrôle Négatif (0.5 ml)** : sérum humain non réactif. *Attention : contient de l'azide de sodium 1%.*

**Lame de verre** : présentent deux carrés de dépôt.

**Pipettes microcapillaires (20)**

**Poire en caoutchouc noire (1)** : à utiliser avec les pipettes micro-capillaires.

**Pipettes en plastique (20)**

**Poire de couleur claire (1)** : à utiliser avec les pipettes en plastique.

**Agitateurs en bois (20)**

#### PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Pour le diagnostic *in vitro* uniquement.
2. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs avec la bouche. Eviter tout contact avec la peau ou les muqueuses. Ne pas fumer, manger ou boire dans les zones de manipulation des échantillons ou des réactifs.
3. Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons, puis se laver les mains avec soin. Les échantillons de patients, les contrôles ainsi que tout matériel ayant été en contact avec ces derniers doivent être manipulés comme du matériel potentiellement infectieux. Du fait qu'aucun test ne peut offrir une assurance totale de l'absence du virus d'immunodéficience humain (VIH), du virus de l'hépatite B ou de tout autre agent infectieux, les contrôles et les échantillons de sérum humain doivent être manipulés avec un niveau de sécurité 2 (Biosafety 2), comme il est recommandé pour tout échantillon de sérum humain potentiellement infectieux dans le manuel CDC/NIH "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories, 1993".
4. Ne pas utiliser les réactifs du coffret après la date d'expiration.
5. Ne pas mélanger les réactifs de coffrets de lots différents.
6. Les réactifs de ce kit contiennent de l'azide de sodium. L'azide de sodium est un irritant cutané. Éviter tout contact des réactifs avec la peau. L'azide de sodium peut réagir avec le plomb et le cuivre des canalisations et former des oxydes métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination des solutions contenant de l'azide de sodium, rincer avec un grand volume d'eau.

#### PREPARATION DES REACTIFS

Les réactifs sont prêts à l'emploi.

Bien agiter les flacons de Réactif I, Réactif II, et Cellules indicatrices avant utilisation, afin d'obtenir une suspension homogène.

#### CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Le coffret complet doit être conservé entre +2 et +8°C.

Lorsqu'il est convenablement conservé, le coffret est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Cette date correspond à celle du réactif qui périmé le plus rapidement. Le kit complet doit être éliminé à cette date.

**NE PAS CONGELER LES REACTIFS.**

La détérioration des Cellules indicatrices est visible lorsqu'il y a hémolyse. Leur réactivité peut être vérifiée par un test de contrôle positif (voir paragraphe Procédure).

#### PREPARATION DES ECHANTILLONS

Aucune préparation spéciale du patient n'est nécessaire avant le prélèvement. Les échantillons utilisés peuvent être constitués de sérum ou de plasma mélangé avec des anticoagulants tels que l'EDTA, l'oxalate de sodium, l'oxalate de potassium, le citrate de sodium, solution de ACD ou héparine.

L'inactivation du sérum n'est pas nécessaire, mais le sérum inactivé peut être utilisé. Les échantillons de sérum ou de plasma doivent être clairs et dénués de particules.

Les anticorps hétérophiles de la mononucléose infectieuse sont relativement stables, et des sérums ou plasma non contaminés peuvent être conservés entre +2 et +8°C plusieurs jours après le prélèvement, avant d'effectuer le test. Si un stockage prolongé est souhaité, l'échantillon doit être congelé.

Les échantillons peuvent être obtenus par prélèvement au bout du doigt, selon la procédure suivante :

1. Utiliser des pipettes capillaires standards (75 mm de long, diamètre intérieur de 1,1 à 1,2 mm, volume 85 µl) héparinées ou non. Prélever au minimum 4 pipettes capillaires pleines à partir d'un piqûre au bout du doigt.

2. Préparer les pipettes capillaires et centrifuger selon la procédure utilisée pour tester les hématocrites.
3. Casser les pipettes capillaires au niveau de l'interface entre sérum ou plasma, et les cellules, et utiliser sérum ou plasma de deux pipettes capillaires comme échantillon de patient, pour chaque côté de la lame de test.

Un échantillon de patient suffisant pour le test (0,05 ml de chaque côté de la lame) est obtenu par cette procédure, si un hématocrite de moins de 50 % est obtenu. Si l'hématocrite est supérieur à 50 %, des pipettes capillaires supplémentaires sont nécessaires pour atteindre le volume d'échantillon souhaité.

#### PROCEDURE DU TEST - METHODE QUALITATIVE

1. Placer la lame sur une surface plane, sous une lumière directe.
2. Mélanger le flacon de *Cellules indicatrices* par inversions successives, afin de remettre les cellules en suspension. En utilisant les pipettes microcapillaires jetables fournies, déposer 10 µl de *Cellules indicatrices* sur un coin des deux carrés de la lame.  
Utilisation des pipettes microcapillaires jetables :
  - a. Introduire le bout de la pipette marqué d'un trait noir épais, dans la poire de caoutchouc (5 mm environ).
  - b. Tenir la poire entre le pouce et le majeur.
  - c. Incliner le flacon de *Cellules indicatrices*, insérer la pipette, et la laisser se remplir par capillarité jusqu'à la marque haute (20 µl). Ne pas aspirer les cellules dans la poire.
  - d. Pour libérer 10 µl de *Cellules indicatrices* sur la lame, placer l'index sur le trou situé au sommet de la poire, et presser doucement jusqu'à ce que le niveau de liquide dans la pipette atteigne la première marque. Poser l'extrémité de la pipette à un angle du carré nommé "I" pour libérer les cellules.
  - e. Déposer les 10 µl de liquide restant dans un coin du carré "II".
3. Déposer une goutte de *Réactif I* bien homogénéisé au centre du carré "I".
4. Déposer une goutte de *Réactif II* bien homogénéisé au centre du carré "II".
5. En utilisant une pipette plastique jetable, ajouter une goutte de sérum ou de plasma à tester au centre de chaque carré sur la lame.
6. En évitant les *Cellules indicatrices*, mélanger le *Réactif I* et le *Réactif II* avec le sérum, dans chaque carré, en tournant une dizaine de fois avec un agitateur en bois propre pour chaque carré. Puis effectuer 10 rotations afin de rajouter au mélange les *Cellules indicatrices*, sur toute la surface de chaque carré. Déclencher le chronomètre dès que le mélange est effectué.
7. NE PAS BOUGER LA LAME DURANT LE TEMPS DE REACTION.
8. Observer les agglutinations éventuelles dans la minute suivant le déclenchement du chronomètre.

#### CONTROLE DE QUALITE - METHODE QUALITATIVE

Les contrôles positif et négatif sont fournis dans chaque coffret. Ces sérums doivent être utilisés pour contrôler les réactifs à leur arrivée au laboratoire, puis périodiquement, durant leur période de validité.

#### RESULTATS - METHODE QUALITATIVE

Les résultats du test indiquent la présence ou l'absence d'anticorps hétérophiles de la mononucléose infectieuse par la présence ou l'absence d'une agglutination, comme indiqué ci-dessous :

**Test positif :** l'agglutination de l'échantillon est plus forte du côté gauche (carré "I") de la lame.

**Test négatif :** l'agglutination de l'échantillon est plus forte du côté droit (carré "II") de la lame,

**ou :** il n'y a aucune agglutination dans les deux carrés, **ou :** il y a agglutination dans les deux carrés en même temps.

L'agglutination qui apparaît après une minute d'incubation, ou qui apparaît lorsque la lame est en mouvement, ne peut pas être considérée comme un résultat positif pour l'anticorps hétérophile de la mononucléose infectieuse.

Un résultat de test positif indique la présence d'anticorps hétérophiles spécifiques de la mononucléose infectieuse. Une procédure de titration peut être effectuée pour donner une indication semi-quantitative du taux d'anticorps hétérophiles présents dans l'échantillon (voir ci-dessous).

#### PROCEDURE DU TEST – TITRATION - METHODE SEMI-QUANTITATIVE

1. Préparer les dilutions suivantes pour le sérum du patient qui a été trouvé positif pour les anticorps hétérophiles de la mononucléose infectieuse par la méthode qualitative :

Numéro du Tube	Dilution	Composition
1	1:2	0,5 ml de sérum du patient + 0,5 ml de solution saline
2	1:4	0,5 ml du tube n°1 + 0,5 ml de solution saline
3	1:8	0,5 ml du tube n°2 + 0,5 ml de solution saline
4	1:16	0,5 ml du tube n°3 + 0,5 ml de solution saline
5	1:32	0,5 ml du tube n°4 + 0,5 ml de solution saline

2. Placer une lame de titration sur une surface plane, sous une lumière directe.
3. Mélanger le flacon de *Cellules indicatrices* par inversions successives, afin de remettre les cellules en suspension. En utilisant une pipette microcapillaire jetable, déposer 10 µl de *Cellules indicatrices* sur un coin de chaque carré de la lame.
4. Déposer une goutte de *Réactif I* bien homogénéisé au centre de chacun des cinq carrés.

5. En utilisant une pipette plastique jetable, ajouter une goutte de chaque dilution de sérum ou de plasma à tester au centre du carré correspondant sur la lame.
6. En évitant les *Cellules indicatrices*, mélanger le *Réactif I* avec l'échantillon dilué, dans chaque carré, en tournant une dizaine de fois avec un agitateur en bois propre pour chaque carré. Puis effectuer 10 rotations afin de rajouter au mélange les *Cellules indicatrices*, sur toute la surface de chaque carré. Déclencher le chronomètre dès que le mélange est effectué.
7. NE PAS BOUGER LA LAME DURANT LE TEMPS DE REACTION.
8. Observer les agglutinations éventuelles dans la minute suivant le déclenchement du chronomètre.

#### RESULTATS - METHODE SEMI-QUANTITATIVE

1. La plus forte dilution pour laquelle apparaît une agglutination représente le point final.
2. Si l'agglutination se produit dans toutes les dilutions, continuer les dilutions à partir du tube n°5 en répétant la procédure décrite ci-dessus.
3. Enregistrer la valeur de titre obtenue. Le titre obtenu avec le test MONOSPOT ne peut pas être comparé avec des titres obtenus par d'autres lames, ou d'autres tubes, car il existe des variations significatives de sensibilité. Cependant, la valeur relative du titre obtenu sur l'échantillon avec différentes techniques est proportionnelle à la concentration en anticorps hétérophiles de la mononucléose infectieuse.
4. Bien que le titre obtenu n'indique pas la gravité de la maladie, des tests successifs effectués avec MONOSPOT pour le même patient peuvent fournir des indications précieuses au clinicien.

#### LIMITES DE LA TECHNIQUE

1. Comme avec tous les tests de diagnostic, les résultats obtenus avec le test MONOSPOT doivent être interprétés à la lumière des symptômes cliniques montrés par le patient.
2. Afin d'obtenir des résultats exacts, n'utiliser que des échantillons de sérum ou de plasma clairs et sans particules. Des résultats faussement positifs ont parfois été observés avec le test MONOSPOT (12, 14). Comme les symptômes cliniques sont similaires à ceux d'autres infections, il est difficile de réfuter la possibilité d'une infection concomitante (15). La simultanéité des infections mononucléosique et hépatique a été démontrée (16). Un résultat faussement positif peut être dû aux anticorps résiduels d'une mononucléose infectieuse persistants après les symptômes cliniques (5, 10).
3. Des infections mononucléosiques séronégatives ont également été reportées (5). De plus, il est possible que les symptômes cliniques et hématologiques de l'infection apparaissent avant qu'une confirmation sérologique ne soit possible, du fait d'une réponse faible en anticorps mononucléosiques (17).

#### PERFORMANCES DU TEST

Lorsque le test est effectué dans les conditions d'usage indiquées, le taux de précision obtenu est supérieur à 99% (18-22). Le résultat peut être combiné avec les observations cliniques et hématologiques pour le diagnostic des mononucléoses infectieuses.

Le MONOSPOT est considéré comme un test hautement spécifique pour les anticorps hétérophiles de la mononucléose infectieuse, grâce à l'utilisation d'absorptions différentielles (2, 23). Le test MONOSPOT utilise des globules rouges frais de sang de cheval, stabilisés, considérés comme étant plus sensibles que les globules rouges de sang de mouton, et que les globules rouges formolés de cheval (6, 23-25).

Ces caractéristiques de performance ont été rassemblées à partir d'un grand nombre d'articles parus dans la littérature scientifique, en plus des tests effectués par le fabricant.

	Mononucléose Infectieuse [26]			Total
		Pos	Neg	
Monospot	Pos	94	2	96
	Neg	6	118	104
	Total	100	120	220

Sensibilité =  $94/100 \times 100\% = 94\%$  - Spécificité =  $118/120 \times 100\% = 98\%$   
 VPP = 97.9% - VPN = 95.1% - Corrélation = 96.3%

**Resumen y explicación**

Durante el proceso de la mononucleosis infecciosa aparecen en el suero de los pacientes ciertos anticuerpos heterófilos, aparentemente únicos. La medición de estos anticuerpos se realiza a través de procesos indirectos.

Un tipo de anticuerpo heterófilo fue descrito originalmente por Forssman y lleva su nombre. El anticuerpo de Forssman pertenece a un grupo de anticuerpos heterófilos que tienen la capacidad de reaccionar con antígenos aparentemente no relacionados con aquellos que estimularon su producción.<sup>1</sup> El anticuerpo heterófilo asociado con la mononucleosis infecciosa no es el mismo que el anticuerpo de Forssman ya que el antígeno del de la MI es una entidad distinta.<sup>2</sup>

Por lo tanto, es necesaria una absorción diferencial del suero o plasma del paciente para diferenciar el anticuerpo heterófilo específico de la mononucleosis infecciosa de otros anticuerpos heterófilos.<sup>3</sup> El principio básico de los pasos de absorción en el producto MONOSPOT es comparable al originalmente propuesto por Davidsohn en su test de aglutinina de oveja.<sup>1,2</sup> Para la detección del anticuerpo heterófilo específico asociado a la MI, MONOSPOT utiliza eritrocitos de caballo frescos y estabilizados (glóbulos rojos) que han mostrado ser mas sensibles que los eritrocitos de oveja o los eritrocitos de caballo en formol.<sup>4</sup>

Enfermedades infecciosas como la gripe, la rubéola, la hepatitis y otras pueden causar síntomas clínicos similares a la mononucleosis infecciosa y presentar problemas en el diagnóstico.<sup>5</sup> El diagnóstico final de la mononucleosis infecciosa depende de los hallazgos clínicos, hematológicos y serológicos.<sup>6</sup>

Aunque habitualmente se observa en adolescentes y adultos jóvenes, la mononucleosis infecciosa ha sido reportada en niños de hasta un año o año y medio<sup>7</sup>, y también en pacientes de más de 60 años. Se han reportado unos pocos ejemplos documentados de la recurrencia de la mononucleosis infecciosa, no obstante, han sido extremadamente excepcionales.<sup>8,9</sup> Se ha visto que una infección respiratoria no específica puede causar una respuesta de anticuerpos heterófilos significativa en pacientes que han tenido mononucleosis infecciosa meses o años antes.<sup>9</sup>

El anticuerpo heterófilo específico de la MI es demostrable habitualmente sobre el sexto hasta el décimo día después del inicio de la enfermedad. Llega a su nivel mas alto durante la segunda y hasta la tercera semana y puede persistir por lo menos durante seis semanas.<sup>10</sup> El nivel de actividad del anticuerpo no se correlaciona con la severidad de la enfermedad o el grado de linfocitosis.<sup>11</sup>

**Principio del procedimiento**

El proceso está basado en la aglutinación de glóbulos rojos de caballo por el anticuerpo heterófilo de la mononucleosis infecciosa. Ya que los glóbulos rojos de caballo contienen ambos antígenos de Forssman y de la MI, es necesaria una absorción diferencial del suero del paciente para diferenciar el anticuerpo heterófilo específico de la MI de los del tipo Forssman. Esto se lleva a cabo absorbiendo el suero o plasma con estroma de riñón de cobaya y con estroma eritrocitario de oveja. El riñón de cobaya contiene solo el antígeno de Forssman mientras que los eritrocitos de oveja contienen solo el antígeno asociado a la mononucleosis infecciosa. Por lo tanto, el riñón de cobaya absorberá solamente anticuerpos heterófilos del tipo Forssman mientras que los eritrocitos de oveja absorberán solamente el anticuerpo heterófilo de la mononucleosis infecciosa. La aglutinación de glóbulos rojos de caballo por la muestra de paciente absorbida es indicativa de una reacción positiva para el anticuerpo heterófilo de la MI (ver Resultados).

**Reactivos**

1. **Reactivo I** (Antígeno de Cobaya) es una suspensión de antígeno de riñón de cobaya conservada en azida sódica (1%).
2. **Reactivo II** (Estroma Eritrocitario de Oveja) es una suspensión de antígeno de estroma eritrocitario de oveja conservada en azida sódica (1%).
3. **Células Indicadoras** (Eritrocitos de Caballo) es una suspensión de glóbulos rojos estabilizados de caballo conservada en cloramfenicol (1:3000), sulfato de neomicina (1:10000) y gentamicina (1:20000).
4. **Suero Control Positivo** (Humano) es suero humano que contiene el anticuerpo heterófilo de la mononucleosis infecciosa conservado en azida sódica (0,1%).
5. **Suero Control Negativo** (Humano) es suero humano que no contiene el anticuerpo heterófilo de la mononucleosis infecciosa conservado en azida sódica (0,1%).

Para el uso en diagnóstico *in vitro*.

**PRECAUCIÓN:** Todos los productos sanguíneos deben ser tratados como potencialmente infecciosos. El material original del cual deriva este producto dio un resultado de test negativo conforme con los tests requeridos por la FDA actualmente. Ningún método conocido puede ofrecer la certeza de que los productos derivados de la sangre humana no transmitirán agentes infecciosos.

**Preparación de los Reactivos**

Los reactivos están listos para el uso. De todos modos, antes de utilizarlos, el Reactivo I, el Reactivo II y las Células Indicadoras deberían agitarse bien para así obtener una suspensión homogénea.

### **Instrucciones para el Almacenamiento**

Si se almacena adecuadamente, el kit es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase. La fecha de caducidad del kit se corresponde con la fecha de caducidad mas corta de alguno de los reactivos. Todo el contenido del kit debería descartarse al alcanzar la fecha de caducidad. Los reactivos deben almacenarse de 2 a 8 °C cuando no se utilizan. NO CONGELE LOS REATIVOS. El deterioro de las Células Indicadoras se manifiesta por la presencia de hemólisis. Puede verificarse una reactividad adecuada a través de un test de control positivo (ver Procedimiento).

### **Toma de muestra y preparación**

No se requiere una preparación especial del paciente antes de la toma de muestra. Se puede utilizar suero o plasma mezclado con anticoagulantes como el EDTA, oxalato sódico, oxalato potásico, citrato sódico, solución ACD o heparina. No es necesaria la inactivación del suero, de todos modos, se puede utilizar suero inactivado. Las muestras de suero o plasma deben ser claras y libres de partículas.

El anticuerpo heterófilo de la mononucleosis infecciosa es relativamente estable y las muestras no contaminadas, o el suero o el plasma pueden ser almacenados de 2 a 8°C durante varios días después de la toma de muestra y antes de realizar el test. Si se desea un almacenamiento prolongado, la muestra del paciente debe ser congelada.

Se puede obtener una muestra para realizar el test con MONOSPOT a partir de la punción del dedo utilizando el procedimiento indicado a continuación:

1. Utilizando pipetas capilares heparinizadas o no heparinizadas Standard (75 mm longitud, 1,1mm a 1,2 mm de diámetro interno, 85µl de volumen), obtenga un mínimo de cuatro pipetas capilares llenas de sangre a partir de punción del dedo.
2. Prepare las pipetas capilares y centrifugue según el procedimiento Standard para el test de hematocrito.
3. Rompa las pipetas capilares en la interfaz entre el suero o plasma y las células y utilice el suero o plasma de dos pipetas capilares como muestra de paciente para cada lado del porta según las instrucciones de uso. Si se obtiene un hematocrito de menos del 50%, se recupera a través de este procedimiento suficiente muestra de paciente para realizar el test (0,05 ml para cada lado del porta). Si el hematocrito fuera superior al 50%, pueden ser necesarias pipetas capilares adicionales para obtener el volumen requerido de muestra.

### **Procedimiento**

#### **Materiales suministrados**

Reactivo I (Riñón de Cobaya) 1 ml

Reactivo II (Estroma Eritrocitario de Oveja) 1 ml

Células Indicadoras (Eritrocitos de Caballo) 20 tests

Suero Control Positivo (Humano) 0,5 ml

Suero Control Negativo (Humano) 0,5 ml

Portaobjetos de vidrio

Pipetas microcapilares, capacidad 20 mcl, para dispensación de las Células Indicadoras

Peras de goma para utilizar junto con las pipetas microcapilares

Pipetas de plástico para dispensar las muestras de suero o plasma

Aplicadores de madera para mezclar.

Todos los materiales necesarios para realizar el test están incluidos en el envase. No se necesita material adicional.

#### **Instrucciones de Uso—Método Cualitativo**

1. Coloque el porta en una superficie plana bajo una fuente de luz directa.
2. Invierta varias veces el vial de las Células Indicadoras para suspender las células uniformemente. Utilizando una de las pipetas microcapilares desechables suministradas, dispense 10 mcl de Células Indicadoras en un rincón de ambos cuadrados del porta.  
Al utilizar las pipetas microcapilares desechables:
  - a. Introduzca el final de la pipeta marcado con una línea negra gruesa algo menos de un centímetro dentro del cuello de la pera de goma.
  - b. Sostenga la pera de goma entre el pulgar y el dedo corazón.
  - c. Incline el vial de Células Indicadoras, introduzca la pipeta y deje que la pipeta se llene por capilaridad hasta la marca superior (20 mcl). No deje entrar células dentro de la pera.
  - d. Para dispensar 10 mcl de Células Indicadoras en el porta, sitúe el dedo índice por encima del agujero situado en la parte superior de la pera y apriete suavemente hasta que el nivel de células en la pipeta alcance la primera marca. Toque con la punta de la pipeta un rincón del cuadrado "I" para liberar las células.
  - e. Dispense las restantes 10 mcl de Células Indicadoras de la pipeta en un rincón del cuadrado "II".
3. Sitúe una gota de Reactivo I mezclado minuciosamente en el centro del cuadrado "I".
4. Sitúe una gota de Reactivo II mezclado minuciosamente en el centro del cuadrado "II".
5. Utilizando una pipeta de plástico desechable, añada una gota de suero o plasma para ser testada en el centro de cada cuadrado del porta.
6. Dejando de lado las Células Indicadoras, mezcle el Reactivo I y el Reactivo II con el suero o plasma en cada cuadrado al menos diez veces utilizando un aplicador de madera limpio para cada cuadrado. Después, y utilizando no más de 10 movimientos de suave agitación, mezcle las Células Indicadoras por toda la superficie de cada cuadrado. Ponga en marcha un cronómetro una vez se complete la mezcla final.

7. NO LEVANTE O MUEVA EL PORTA DURANTE EL PERIODO DE REACCION.
  8. Vea si aparece aglutinación hasta máximo un minuto después de la mezcla final.
- Ambos sueros controles positivo y negativo son suministrados dentro de cada envase. Estos sueros control deben utilizarse chequear los reactivos una vez lleguen al laboratorio y periódicamente durante la vida del kit.

#### Resultados—Método Cualitativo

Si se realiza adecuadamente, el test indicará la presencia o ausencia del anticuerpo heterófilo de la mononucleosis infecciosa a través de la presencia o ausencia de aglutinación, tal como se indica a continuación.

**TEST POSITIVO** Si el patrón de aglutinación es **mas fuerte** en el lado **izquierdo** del porta (Cuadrado I), el test es **positivo**.

**TEST NEGATIVO** Si el patrón de aglutinación es **mas fuerte** en el lado **derecho** del porta (Cuadrado II), el test es **negativo**.  
\*Si no aparece aglutinación en ningún cuadrado del porta (I y II), o si la aglutinación es igual en ambos cuadrados del porta (I y II), el test es negativo.

La aglutinación que aparece después del minuto de tiempo de lectura o la que aparece cuando el porta es movido o balanceado no debe ser interpretada como un resultado positivo para el anticuerpo heterófilo de la mononucleosis infecciosa.

Un resultado de test positivo es indicativo del anticuerpo heterófilo específico para la mononucleosis infecciosa. Se puede realizar un procedimiento de titulación, como el descrito a continuación, para aportar una indicación semicuantitativa del nivel de anticuerpo heterófilo de la mononucleosis infecciosa.

#### Procedimiento de Titulación

##### Instrucciones de uso—Método Semicuantitativo

1. Prepare las siguientes diluciones del suero ya conocido de ser positivo para el anticuerpo heterófilo de la mononucleosis infecciosa.

TUBO	DILUCIÓN	COMPOSICIÓN
1	1:2	0,5 ml de suero de paciente + 0,5 ml de salina fisiológica; mezclar
2	1:4	0,5 ml del tubo 1 + 0,5 ml de salina fisiológica; mezclar
3	1:8	0,5 ml del tubo 2 + 0,5 ml de salina fisiológica; mezclar
4	1:16	0,5 ml del tubo 3 + 0,5 ml de salina fisiológica; mezclar
5	1:32	0,5 ml del tubo 4 + 0,5 ml de salina fisiológica; mezclar

2. Coloque un porta de titulación sobre una superficie plana bajo una fuente de luz directa.
3. Invierta varias veces el vial de las Células Indicadoras para suspender las células uniformemente. Utilizando una de las pipetas microcapilares desechables suministradas, dispense 10 mcl de Células Indicadoras en un rincón de ambos cuadrados del porta.
4. Coloque una gota del Reactivo I, previamente mezclado suavemente, en el centro de cada uno de los cinco cuadrados.
5. Utilizando una pipeta de plástico desechable, coloque una gota de cada una de las diluciones en el centro de su correspondiente cuadrado (tubo 1 en el cuadrado 1, etc.).
6. Dejando de lado las Células Indicadoras, mezcle el reactivo y las muestras diluidas en cada cuadrado al menos diez veces utilizando un aplicador de madera limpio. Después, y utilizando no más de 10 movimientos de suave agitación, mezcle las Células Indicadoras por toda la superficie de cada cuadrado. Ponga en marcha un cronómetro una vez se complete la mezcla final.
7. NO LEVANTE O MUEVA EL PORTA DURANTE EL PERIODO DE REACCION.
8. Vea si aparece aglutinación hasta máximo un minuto después de la mezcla final.

#### Resultados—Método Semicuantitativo

1. La dilución más alta en la que aparezca aglutinación visible es el punto final. (Si la aglutinación está presente en todas las diluciones, realice más diluciones dobles desde el tubo 5 y repita el procedimiento indicado anteriormente.
2. Anote el valor de titulación obtenido. El título con MONOSPOT no puede ser comparado con los valores de titulación obtenidos con otros procedimientos a través de porta o tubo ya que existen variaciones significativas en la sensibilidad. No obstante, la magnitud relativa de los títulos realizados en muestras con diferentes técnicas, es proporcional a la concentración de anticuerpo heterófilo de la MI presente.
3. Aunque el valor de titulación no es indicativo de la severidad de la enfermedad, el testar de forma secuencial al paciente con MONOSPOT puede aportar información de valor al clínico.

#### Limitaciones del Procedimiento

Para obtener resultados precisos, solamente deben utilizarse muestras de suero o plasma que sean claras y libres de partículas. Se han reportado con MONOSPOT casos de falsos positivos.<sup>12-14</sup> Ya que los síntomas clínicos de la MI son similares a los de otras enfermedades, a menudo es difícil descartar la posibilidad teórica de una infección concomitante.<sup>15</sup> Se ha reportado la existencia simultánea de mononucleosis infecciosa y hepatitis.<sup>16</sup> Un resultado que se interprete como falso positivo puede posiblemente ser debido a anticuerpo residual de la mononucleosis infecciosa presente después de que los síntomas clínicos hayan disminuido.<sup>5, 10</sup>

También se ha reportado la mononucleosis infecciosa seronegativa.<sup>5</sup> Debido a una respuesta retardada de anticuerpo heterófilo, es posible que los síntomas clínicos y hematológicos de la MI aparezcan antes de que la confirmación serológica sea posible.<sup>17</sup>

### Características del funcionamiento

Cuando el test con MONOSPOT se realiza siguiendo las instrucciones de uso, se puede obtener una precisión mayor del 99%.<sup>18-22</sup> Para el diagnóstico de la mononucleosis infecciosa, el resultado debe combinarse con los datos clínicos y hematológicos.

MONOSPOT ha mostrado ser elevadamente específico para el anticuerpo heterófilo de la mononucleosis infecciosa a través de la utilización de la absorción diferencial.<sup>2, 23</sup> MONOSPOT utiliza glóbulos rojos de caballo frescos y estabilizados, los cuales han mostrado ser mas sensibles que los glóbulos rojos de oveja o los glóbulos rojos de caballo en formol.<sup>6, 23-25</sup> Estas características del funcionamiento han sido recopiladas desde un gran número de documentos que han aparecido en la literatura científica, además de los diferentes tests realizados por el fabricante.

Monospot	Mononucleosis Infecciosa [26]		
	Pos	Neg	Total
Pos	94	2	96
Neg	6	118	104
Total	100	120	220

Sensibilidad =  $94/100 \times 100\% = 94\%$  - Especificidad =  $118/120 \times 100\% = 98\%$   
VPP = 97.9% - VPN = 95.1% - Correlacion = 96.3%

DEUTSCH

### MONOSPOT™ Best. Nr. 776060 – 20 tests Test zum Nachweis von Heterophilen Antikörpern bei Infektiöser Mononukleose

#### Zusammenfassende Erläuterung

Antikörper einer besonderen Klasse, sogenannte heterophile Antikörper, erscheinen während des Krankheitsverlaufs der Infektiösen Mononukleose im Serum der Patienten. Die Bestimmung dieser Antikörper erfolgt durch indirekte Methoden.

Ein Typ von heterophilen Antikörpern wurde ursprünglich von Forssman beschrieben und trägt seinen Namen. Die Forssman Antikörper gehören zu einer Gruppe von heterophilen Antikörpern, die mit Antigenen reagieren können, die allem Anschein nach nichts mit denjenigen Antigenen zu tun haben, durch die sie hervorgerufen wurden<sup>1</sup>. Die mit der Infektiösen Mononukleose in Verbindung gebrachten heterophilen Antikörper sind jedoch nicht identisch mit den Forssman Antikörpern<sup>2</sup>.

Eine differentielle Vorabsorption des Patientenserums oder –plasmas ist daher notwendig, um die heterophilen Antikörper der Infektiösen Mononukleose von anderen heterophilen Antikörpern unterscheiden zu können<sup>3</sup>. Das Grundprinzip der Absorptionsschritte im MONOSPOT ist vergleichbar zum Vorgehen, wie es ursprünglich von Davidsohn in seinem Schaf-Agglutinin-Test vorgeschlagen worden war<sup>1,2</sup>. Zum Nachweis von spezifischen heterophilen Antikörpern bei IM werden im MONOSPOT Test frische, stabilisierte Pferdeerythrozyten eingesetzt, da sich gezeigt hat, dass diese sensitiver als Schaferythrozyten oder mit Formalin behandelte Pferdeerythrozyten sind<sup>4</sup>.

Infektionskrankheiten wie Influenza, Rubella, Hepatitis und andere können die gleichen klinischen Symptome wie die Infektiöse Mononukleose hervorrufen und Probleme bei der Diagnostik bereiten<sup>5</sup>. Die endgültige Diagnose einer Infektiösen Mononukleose ergibt sich aus der Kombination von klinischen, hämatologischen und serologischen Abklärungen<sup>6</sup>.

Obwohl die Infektiöse Mononukleose normalerweise bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen beobachtet wird, wurde auch über Fälle sowohl bei Kindern im Alter von einhalb Jahren<sup>7</sup>, als auch bei Patienten mit über 60 Jahren berichtet. Einige wenige Beispiele belegen eine Reaktivierung von Infektiöser Mononukleose, sie sind jedoch extrem selten<sup>8,9</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten, die vor Monaten oder Jahren an Infektiöser Mononukleose erkrankt waren, eine nicht-spezifische Infektion der Atemwege eine signifikante Antwort von heterophilen Antikörpern hervorrufen kann<sup>9</sup>.

Die spezifischen heterophilen Antikörper bei IM sind normalerweise ab dem sechsten bis zehnten Tag nach Krankheitsbeginn nachweisbar. Sie erreichen einen Höchstwert während der zweiten bis dritten Woche und können mindestens sechs Wochen lang persistieren<sup>10</sup>. Die Höhe des Antikörperspiegels steht nicht mit dem Schweregrad der Krankheit oder dem Ausmass einer Lymphozytose im Zusammenhang<sup>11</sup>.

#### Testprinzip

Das Testprinzip basiert auf der Agglutination von Pferdeerythrozyten durch die heterophilen Mononukleose-Antikörper. Pferdeerythrozyten enthalten sowohl Forssman als auch IM Antigene. Eine Vorabsorption des Patientenserums ist daher notwendig, um zwischen den spezifischen heterophilen IM Antikörpern und den Forssmann Antikörpern unterscheiden zu können. Dies wird durch eine Vorabsorption des Serums oder Plasmas sowohl mit Meerschweincheniere als auch mit Rindererythrozytenstroma erreicht. Meerschweincheniere enthält Forssmann-Antigene, während Rindererythrozyten IM-Antigene enthalten. Aus diesem Grund werden heterophile Antikörper vom Forssmann Typ nur von Meerschweincheniere und heterophile IM Antikörper nur von Rindererythrozyten adsorbiert. Wenn bei der mit Meerschweincheniere adsorbierten Patientenprobe eine stärkere Agglutination der Pferdeerythrozyten zu beobachten ist als bei der mit Rindererythrozyten behandelten Probe, so ist das Testresultat für IM positiv (s. unter Ergebnisse).

### Reagenzien

1. **Reagenz I** (Meerschweinchenantigen): Antigen-Suspension aus Meerschweinchenniere, stabilisiert mit Natriumazid (1%)
2. **Reagenz II** (Rindererythrozyten-Stroma): Antigen-Suspension aus Rindererythrozytenstroma, stabilisiert mit Natriumazid (1%)
3. **Indikator-Zellen** (Pferdeerythrozyten): Suspension aus stabilisierten Pferde-erythrozyten, konserviert mit Chloramphenicol (1:3000), Neomycinsulfat (1:10000) und Gentamycin (1:20000).
4. **Positives Kontrollserum** (human): Humanes Serum mit heterophilen Mononukleose-Antikörpern, stabilisiert mit Natriumazid (0.1%).
5. **Negatives Kontrollserum** (human): Humanes Serum ohne heterophilen Mononukleose-Antikörpern, stabilisiert mit Natriumazid (0.1%).

Für die in-vitro-Diagnostik bestimmt.

VORSICHT: Alle Blutprodukte sollten als potentiell infektiös behandelt werden. Das Ausgangsmaterial für diesen Testkit wurde mit den von der FDA vorgeschriebenen Tests als nicht-infektiös getestet. Keine Testmethode kann jedoch sicherstellen, dass humane Blutprodukte keine infektiösen Krankheiten übertragen können.

### Herstellung der Reagenzien

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig. Reagenz I, Reagenz II und die Indikatorzellen vor Gebrauch jedoch gut durchmischen, um eine homogene Suspension zu erhalten.

### Lagerungsbedingungen

Bei vorschriftsmässiger Lagerung ist der Testkit bis zum auf der Packung angegebenen Datum haltbar. Das Verfalldatum auf der Packung gibt das kürzeste Verfalldatum aller Kitkomponenten wieder. Kit nach Ablauf des Verfalldatums vernichten. Reagenzien bei 2-8°C aufbewahren. NICHT EINFRIEREN. Ein Verfall der Indikatorzellen wird durch Hämolyse erkennbar. Die Reaktivität kann anhand eines positiven Kontrolltests überprüft werden (s. Durchführung).

### Probensammlung und Probenaufbereitung

Vor der Probenentnahme sind keine besonderen Vorbereitungen des Patienten zu treffen. Verwendet werden kann Serum oder Plasma, das mit Antikoagulantien wie EDTA, Kaliumoxalat, Natriumcitrat, ACD oder Heparin versetzt wurde. Einsatz von inaktiviertem Serum ist nicht notwendig, aber möglich. Die Serum- oder Plasmaproben müssen klar und partikelfrei sein. Der heterophile Mononukleose-Antikörper ist relativ stabil und nicht kontaminierte Proben können nach der Entnahme bis zur Testdurchführung einige Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden. Zur längeren Lagerung müssen die Patientenproben eingefroren werden.

Im MONOSPOT kann auch Kapillarblut eingesetzt werden:

1. Genormte, heparinisierte oder nicht-heparinisierte Kapillaren (75 mm Länge, 1.1 – 1.2 mm Innendurchmesser, 85 µl Volumen) einsetzen und mindestens 4 Kapillaren voll Blut aus dem Finger entnehmen.
2. Kapillaren vorbereiten und nach Standardvorschrift zur Hämatokritbestimmung zentrifugieren.
3. Kapillaren an der Grenzschicht zwischen Serum oder Plasma und Zellen zerbrechen. Serum oder Plasma aus zwei Kapillaren gemäss Testanleitung als Patientenprobe auf jeder Seite des Objektträgers auftragen. Ausreichend Patientenprobe für den Test (0.05 ml für jede Seite des Objektträgers) wird erhalten, wenn der Hämatokritwert unter 50% liegt. Wenn der Hämatokritwert über 50% liegt, müssen möglicherweise mehr als zwei Kapillaren eingesetzt werden, um ausreichend Probe zu erhalten.

### Durchführung

#### Mitgeliefertes Material

- Reagenz I (Meerschweinchen Niere): 1 ml
- Reagenz II (Rindererythrozytenstroma): 1 ml
- Indikatorzellen (Pferdeerythrozyten): 20 Tests
- Positives Kontrollserum (human): 0.5 ml
- Negatives Kontrollserum (human): 0.5 ml
- Glas-Objektträger
- Mikrokapillaren: 20 µl zur Dispensation der Indikatorzellen
- Gummihütchen für die Mikrokapillaren
- Plastikpipetten zum Auftragen von Serum oder Plasma
- Holzstäbchen zum Mischen

Alle zur Testdurchführung notwendigen Materialien sind im Kit inbegriffen, es sind keine zusätzlichen Materialien notwendig.

### Testanleitung – Qualitative Methode

1. Objektträger auf eine flache Unterlage unter eine direkte Lichtquelle legen.

2. Fläschchen mit Indikatorzellen mehrere Male umschwenken, um die Zellen gleichmässig zu suspendieren. Mit Hilfe einer Mikrokapillare aus dem Kit 10  $\square$  Indikatorzellen in je eine Ecke der beiden angezeichneten Quadrate auf dem Objektträger geben.  
Zur Verwendung der Einmal-Mikrokapillaren:
    - a) Gummihütchen auf das mit einer schwarzen Linie gekennzeichnete Ende der Kapillare aufsetzen.
    - b) Gummihütchen zwischen Daumen und Mittelfinger halten.
    - c) Fläschchen mit Indikatorzellen leicht schräg halten, Kapillare eintauchen und durch Kapillarkraft bis zur oberen Marke (20  $\square$ ) füllen. Keine Zellen in das Gummihütchen aufsaugen.
    - d) Um 10  $\square$  der Indikatorzellen auf den Objektträger aufzutragen, Zeigefinger auf das Loch im Gummihütchen legen, Hütchen leicht drücken und Zellen bis zur ersten Markierung auslaufen lassen. Kapillarenspitze in eine Ecke von Quadrat I auflegen, um die Zellen auslaufen zu lassen.
    - e) Die verbleibenden 10  $\square$  der Indikatorzellen in eine Ecke von Quadrat II aufbringen.
  3. Einen Tropfen des zuvor sorgfältig gemischten Reagenz I in die Mitte von Quadrat I geben.
  4. Einen Tropfen des zuvor sorgfältig gemischten Reagenz II in die Mitte von Quadrat II geben.
  5. Mit Hilfe einer Einmal-Plastikpipette je einen Tropfen Serum oder Plasma in die Mitte eines jeden Quadrates geben.
  6. Mit je einem Holzstäbchen für jedes Quadrat die Reagenzien I, bzw. II mit dem Serum oder Plasma gründlich vermischen, ohne die Indikatorzellen mit einzubeziehen. Anschliessend die Indikatorzellen mit nicht mehr als 10 Kreisbewegungen über das gesamte jeweilige Quadrat verteilen. Danach sofort Stoppuhr starten.
  7. OBJEKTTRÄGER WÄHREND DER INKUBATIONSZEIT NICHT BEWEGEN.
  8. Innerhalb einer Minute die Agglutination ablesen.
- Ein positives und ein negatives Kontrollserum werden mit jeder Packung mitgeliefert. Diese Kontrollseren sollten nach Erhalt der Packung und weiter in regelmässigen Abständen eingesetzt werden, um den Testkit zu überprüfen.

#### Ergebnisse - Qualitative Methode

Bei korrekter Durchführung des Tests wird, wie weiter unten beschrieben, das Vorhandensein heterophiler Mononukleose Antikörper durch Agglutination angezeigt.

**POSITIVER TEST** Wenn das Agglutinationsmuster auf der linken Seite des Objektträgers (Quadrat I) ausgeprägter ist als auf der rechten Seite, ist der Test als **positiv** zu bewerten.

**NEGATIVER TEST** Wenn das Agglutinationsmuster auf der rechten Seite des Objektträgers (Quadrat II) ausgeprägter ist als auf der linken Seite, ist der Test als **negativ** zu bewerten.

\*Wenn in keinem der Quadrate (I oder II) auf dem Objektträger eine Agglutination feststellbar ist oder wenn sie auf beiden Seiten gleich stark ist, ist der Test als negativ zu bewerten.

Eine Agglutination, die erst nach Ablauf der Inkubationszeit von einer Minute auftritt oder die durch Schütteln oder Bewegen des Objektträgers zustande kommt, ist nicht als ein positives Ergebnis auf heterophile Mononukleose-Antikörper zu werten.

Ein positives Ergebnis zeigt das Vorhandensein von heterophilen Mononukleose-Antikörpern an. Um die Höhe des Titers in einem halbquantitativen Ergebnis zu erhalten, kann das Serum, wie unten beschrieben, ausstitriert werden.

#### Vorgehen zur Titration

##### Testanleitung – Halbquantitative Methode

1. Herstellung von verschiedenen Verdünnungen des Patientenserums, welches ein positives Testergebnis für heterophile Mononukleose-Antikörper ergeben hat:

RÖHRCHEN NR.	VERDÜNNUNG	MISCHUNGSVERHÄLTNIS
1	1:2	0.5 ml Patientenserum + 0.5 ml physiologische Kochsalzlösung vermischen
2	1:4	0.5 ml aus Röhrchen 1 + 0.5 ml physiologische Kochsalzlösung vermischen
3	1:8	0.5 ml aus Röhrchen 2 + 0.5 ml physiologische Kochsalzlösung vermischen
4	1:16	0.5 ml aus Röhrchen 3 + 0.5 ml physiologische Kochsalzlösung vermischen
5	1:32	0.5 ml aus Röhrchen 4 + 0.5 ml physiologische Kochsalzlösung vermischen

2. Den Objektträger für die Titerbestimmung auf eine ebene Fläche unter eine direkte Lichtquelle legen.
3. Fläschchen mit Indikatorzellen mehrere Male umschwenken, um die Zellen gleichmässig zu suspendieren. Mit Hilfe einer Mikrokapillare aus dem Kit 10  $\square$  Indikatorzellen in je eine Ecke der angezeichneten Quadrate auf dem Objektträger geben.
4. Einen Tropfen des sorgfältig gemischten Reagenz I in die Mitte von allen fünf Quadraten geben.
5. Mit Hilfe einer Einweg-Plastikpipette einen Tropfen jeder Testverdünnung in die Mitte des entsprechenden Quadrates (z.B. Röhrchen 1 in Quadrat 1 usw.) geben.
6. Mit Hilfe eines Rührstäbchens das Reagenz und die verdünnte Probe gut vermischen (mind. 10x umrühren), die Indikatorzellen dabei zunächst nicht mit einbeziehen. Danach in weniger als 10 Rührbewegungen die Indikatorzellen über das ganze Quadrat verteilen. Danach Stoppuhr betätigen.
7. WÄHREND DER INKUBATIONSZEIT OBJEKTTRÄGER NICHT BEWEGEN.
8. Ergebnis innerhalb einer Minute nach dem Mischen ablesen.

#### Ergebnisse – Halbquantitative Methode

1. Die grösste Verdünnung, bei der noch eine Agglutination auszumachen ist, als Endpunkt nehmen. (Wenn mit allen Verdünnungen eine Agglutination auftritt, weitere Verdünnungen aus Röhrchen Nr. 5 herstellen und den Test, wie oben beschrieben, wiederholen.)
2. Titerstufe notieren. Der Monospot-Titer kann nicht mit den Titern aus anderen Tests verglichen werden, da jeder Test eine andere Sensitivität aufweist. Die mit verschiedenen Techniken erzielte, relative Titerstufe ist jedoch proportional zur Konzentration der heterophilen Mononukleose-Antikörper in der Probe.
3. Obwohl die Titerstufe selbst keine Aussage über den Schweregrad der Krankheit liefert, kann ein Folgeserum des gleichen Patienten dem Arzt wichtige Hinweise geben.

#### Grenzen des Verfahrens

Um verlässliche Resultate zu erzielen, sollten nur klare, partikelfreie Serum- oder Plasmaproben eingesetzt werden. Über falsch positive Resultate mit MONOSPOT wurde berichtet<sup>12-14</sup>. Da die klinischen Symptome der IM häufig ähnlich sind zu denen anderer Krankheiten, ist es häufig schwierig, eine Koinfektion auszuschliessen<sup>15</sup>. Über das gleichzeitige Auftreten von Infektiöser Mononukleose und Hepatitis ist berichtet worden<sup>16</sup>. Ein Ergebnis, das als falsch positiv interpretiert werden könnte, kann auch von noch persistierenden heterophilen Mononukleose-Antikörpern einer abgelaufenen Infektion herrühren<sup>5,10</sup>. Es wurde auch über Fälle von seronegativer Infektiöser Mononukleose berichtet<sup>5</sup>. Aufgrund einer verzögerten Antikörperantwort ist es auch möglich, dass klinische und hämatologische Symptome der Infektiösen Mononukleose auftreten, noch bevor eine serologische Bestätigung möglich ist<sup>17</sup>.

#### Leistungsmerkmale

Wenn der MONOSPOT Test gemäss der Arbeitsanleitung durchgeführt wird, kann eine Genauigkeit von über 99% erreicht werden<sup>18-22</sup>. Zur Diagnose einer Infektiösen Mononukleose muss das Ergebnis im Zusammenhang mit anderen klinischen und hämatologischen Ergebnissen gesehen werden. MONOSPOT hat sich durch die differentielle Absorption als hoch spezifisch für heterophile Mononukleose-Antikörper erwiesen<sup>2,23</sup>. MONOSPOT verwendet frische, stabilisierte Pferdeerythrozyten, welche sich als sensitiver als Schaferythrozyten oder formalinbehandelte Pferdeerythrozyten erwiesen haben<sup>6,23-25</sup>. Diese Leistungsmerkmale wurden, ergänzend zu eigenen Tests des Herstellers, aus einer Vielzahl von wissenschaftlichen Veröffentlichungen zusammengestellt.

Monospot	Mononucleosis Infeciosa [26]			Total
		Pos	Neg	
Pos	94	2	96	
Neg	6	118	104	
Total	100	120	220	

Sensitiv =  $94/100 \times 100\% = 94\%$  - Spezifisch =  $118/120 \times 100\% = 98\%$   
 VPP = 97.9% - VPN = 95.1% - Übereinstimmung = 96.3%

#### RISK AND SAFETY PHRASES

##### REAGENT 1 - REAGENT 2: TOXIC - SODIUM AZIDE

##### RISK PHRASES

R25 - Toxic if swallowed/Tossico per ingestione/Toxique en cas d'ingestion/Toxico por ingestion/Giftig beim verschlucken.  
 R32 - Contact with acids liberates very toxic gas/A contatto con acidi libera gas molto tossico/Au contact d'un acid ,dégage un gaz très toxique/En contacto con acidos libera gases muy toxicos/Entwickelt bei Berührung mit säure sehr giftige gase.

##### SAFETY PHRASES

S45 - In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible) / In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta) / En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette) / En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta) / Bei unfall oder unwohlsein sofort arzt zuziehen (wenn möglich, dieses etikett vorzeigen).

##### POSITIVE CONTROL - NEGATIVE CONTROL: HARMFUL - SODIUM AZIDE

##### RISK PHRASES

R22 - Harmful if swallowed / Nocivo per ingestione / Nocif en cas d'ingestion / Nocivo por ingestion / Gesundheitsschädlich beim verschlucken.  
R32 - Contact with acids liberates very toxic gas / A contatto con acidi libera gas molto tossico / Au contact d'un acid,dégage un gaz très toxique / En contacto con acidos libera gases muy toxicos / Entwickelt bei Berührung mit säure sehr giftige gase.

## REFERENCES

1. Davidsohn I., Walker P.H. The nature of the heterophilic antibodies in infectious mononucleosis. I. Am. J. Clin. Pathol. 1935; 5: 455.
2. Davidsohn I. Serologic diagnosis of infectious mononucleosis. JAMA 1937; 108: 289.
3. Lee C.L., Davidsohn I., Panczyszyn O. Horse agglutinins in infectious mononucleosis II - the spot test. Am. J. Clin. Pathol. 1968; 49: 12.
4. Lee C.L., Davidsohn I., Slaby R. Horse agglutinins in infectious mononucleosis. Am. J. Clin. Pathol. 1968; 49: 3.
5. Carter R.L., Penman H.G. Infectious mononucleosis. Blackwell Scientific Publications 1968.
6. Lee C.L., Davidsohn I. Spot test for infectious mononucleosis. Exhibit, Joint Annual Meeting ASCP and CAP 1967.
7. Starling K.A., Fernbach D.J. Infectious mononucleosis in the preschool child. Letters to the Journal, JAMA 1968; 203: 810.
8. Bender C.E. Recurrent mononucleosis. JAMA 1962; 182: 954.
9. Hoagland R.J. Resurgent heterophil-antibody reaction after mononucleosis. N. Engl. J. Med. 1963; 269: 1307.
10. Lee C.L., Davidsohn I. Serologic tests for infectious mononucleosis. Comm on Continuing Educ. Council on Immunohematology ASCP 1972.
11. Wintrobe M.M. Infectious mononucleosis. In Harrison T.R.: Principles of Internal Medicine. The Blackiston Company 1950.
12. Sadoff L., Goldsmith O. False positive infectious mononucleosis spot test in pancreatic carcinoma. JAMA 1971; 218: 1297.
13. Philips G.M. False-positive MONOSPOT test result in rubella. Letters to the Journal, JAMA 1972; 222: 585.
14. Horwitz C.A., Polesky H., Stillman T., Ward P.C.J., Henle G., Henle W. Persistent haemagglutination for infectious mononucleosis in rheumatoid arthritis. Br. Med. J. 1973; 1: 591.
15. Tri T.B., Herbst K. False-positive MONOSPOT or rubella and mononucleosis. Letters to the Journal, JAMA 1973; 255: 63.
16. Madhavan T. hepatitis and infectious mononucleosis. Letters to the Journal, JAMA 1973; 225: 314.
17. Bæhner R.L., Shuler S.E. Infectious mononucleosis in childhood. Clin. Pediatr. (Phila) 1967; 6: 393.
18. Davidsohn I., Henry J.B. Todd-Sanford clinical diagnosis by laboratory methods. 14th edition. W.B. Saunders Company 1969.
19. Wahren B. Diagnosis of infectious mononucleosis by the MONOSPOT test. Am. J. Clin. Pathol. 1969; 52: 303.
20. Galloway E. Comparison of three slide tests for infectious mononucleosis with Davidsohn's presumptive and differential heterophile test. Can. J. Med. Tech. Dec. 1969; 31: 197.
21. Seitanidis B. A comparison of the MONOSPOT with the Paul-Bunnell test in infectious mononucleosis and other diseases. J. Clin. Pathol. 1969; 22: 321.
22. Evans D.M.D., Sanerkin N.G., Lewis J. Facilitating the laboratory diagnosis of infectious mononucleosis. Am. J. Clin. Pathol. 1969; 52: 702.
23. Lee C.L. Spot test for infectious mononucleosis. Bull. of Pathol. 1968; 9: 78.
24. Barrett A.M. The serological diagnosis of glandular fever (infectious mononucleosis); a new technique. J. Hyg. (Camb) 1941; 41: 330.
25. Wilkinson P.C., Carmichael D.S. Immunochemical characterization and serologic behavior of antibodies against red cells in infectious mononucleosis. J. Lab. Clin. Med. 1964; 64: 529.
26. Tilton RC et al. Comparative evaluation of three commercial tests for detection of heterophile antibody in patients with infectious mononucleosis. J Clin Microbiol 1988;26:275-278.

 **Meridian Bioscience Europe Srl**  
Via dell' Industria, 7  
I-20020 Villa Cortese, Milano - Italy  
Tel: +39 (0331) 43 36 36  
Fax: +39 (0331) 43 36 16  
E-mail: info@mdeur.com

**Meridian Bioscience Europe sa/nv**  
Rue de l'Industrie, 7  
B-1400 Nivelles - Belgium  
Tel: +32 (67) 89 59 59  
Fax: +32 (67) 89 59 58  
E-mail: info@mdeur.be

**Meridian Bioscience Europe France**  
Le Quadra, Promenade des Anglais, 455  
F-06299 Nice Cedex 3 - France  
Tel: +33 (4) 93 18 72 10  
Fax: +33 (4) 93 18 72 11  
E-mail: info@meridianbioscience.fr

**Meridian Bioscience Europe bv**  
Halderheiweg, 6  
NL-5282 SN Boxtel - The Netherlands  
Tel: +31 (411) 62 11 66  
Fax: +31 (411) 62 48 41  
E-mail: meridian@wxs.nl

**Meridian Bioscience, Inc.**  
Corporate Office  
3471 River Hills Drive  
Cincinnati, Ohio 45244, USA  
Tel: +1 (513) 271 37 00  
Fax: +1 (513) 271 37 62  
E-mail: mbi@meridianbioscience.com

Website [www.mdeur.com](http://www.mdeur.com)



Expiry date / Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad/ Haltbarkeitsdatum



Lot number / Numéro de lot / Numero di lotto/ Número de lote / Chargenbezeichnung



For in vitro diagnostic use / Usage in vitro/ Per uso diagnostico in vitro Uso diagnóstico in vitro / In vitro Diagnosticum

This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79 CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro/ Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro/ Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro/ Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostica 98/79/EG



Catalogue number / Référence article/Codice dell'articolo/ Número de catálogo / Artikelnummer



Please read pack insert / Lire attentivement le mode d'emploi / Leggere il foglietto informativo/ Leer instrucciones de uso / Bitte Packungsbeilage beachten



Manufactured by / Fabriqué par/ Prodotto da / Fabricado por / Hergestellt von



Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n"tests/ Contenido suficiente per "n" prove/ Contenido suficiente para <n> ensayos / Enthält ausreichend für <n> Tests



Conservare a/ Store at / Conserver entre/ Conservar a/ Lagerung bei

Rev. 2/04