

MERIFLUOR[®]

EBV-EA IgG IFA

Immunofluorescence assay for detection of IgG antibodies to EBV-EA in human serum

REF EA101

IVD In vitro diagnostic medical device

R. Only

INTENDED USE

The MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test is a sensitive and rapid immunofluorescence method for the qualitative and quantitative detection of antibodies to early antigen (EA) of Epstein-Barr virus (EBV) in human serum. When performed according to instructions, the MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test detects IgG antibodies to the diffuse (D) and restricted (R) components of the EBV-EA complex. It is of value in providing supportive information for the diagnosis of EBV-associated disease.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Epstein-Barr virus is a widely-disseminated human pathogen which commonly causes infection in early childhood, resulting in asymptomatic or mild disease. Individuals who contract infection with EBV in early adult life frequently develop classic infectious mononucleosis (IM). Approximately half of the patients with IM develop splenomegaly with a smaller percentage having hepatomegaly or both.¹ Abnormal liver function is more marked with EBV mononucleosis than in CMV-associated mononucleosis and both disease conditions must be considered in the differential diagnosis of hepatitis.²

Infections with EBV can result in complications involving the neurologic, cardiac, ocular, respiratory, hematologic, digestive and renal systems.³ Associated neurologic syndromes include Bell's palsy, Guillain-Barre syndrome, meningoencephalitis, Reye's syndrome, myelitis, cranial nerve neuritis, and psychotic disorders.^{4, 5} Bulbar involvement with ensuing respiratory paralysis can be fatal.⁵ Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma and neoplasias of the thymus, parotid gland and supraglottic larynx have also been associated with EBV infections.^{6, 7, 8, 9}

Like other herpes viruses, EBV establishes a latent infection.¹⁰ The genome resides in B cells of the lymphoreticular system and epithelial cells of the oropharynx.¹¹ Blood transfusion from an immune donor to a non-immune recipient may produce a primary infection in the recipient known as IM post-perfusion syndrome.¹² Reactivation of latent infection has been implicated in persistent illness referred to as chronic mononucleosis or chronic EBV infection. Persistent infection with EBV may be a possible cofactor in the development of AIDS in asymptomatic individuals infected with human immunodeficiency virus (HIV).¹³

Infection with EBV results in the expression of viral capsid antigen (VCA), early antigen (EA), and nuclear antigen (NA) with corresponding antibody responses. The synthesis of EA occurs early in viral replication, prior to DNA synthesis.¹⁴ In acute disease, IgM and IgG antibodies to VCA are present and IgG antibodies to EA may be present.⁶ The presence of antibodies to EA in conjunction with antibodies to NA helps substantiate reactivation of EBV infection.^{15, 16} Elevated levels of IgG to EA and VCA frequently occur in patients with chronic mononucleosis and in immunocompromised or elderly patients upon reactivation of latent EBV infection.^{13, 16} A persistent elevated antibody response to EA in the presence of antibodies to NA is a serologic feature indicative of a reactivation or persistently active infection with EBV.¹³

The indirect fluorescent antibody (IFA) technique is a valuable serological procedure for the determination of antibody status to the EA of EBV. The MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test detects antibodies to the D and R components of EA and is not intended to differentiate between antibodies to these antigens. Screening for the presence of antibodies to EA and other EBV-associated antigens can provide important diagnostic information.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

The indirect fluorescent antibody (IFA) method is used in the MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test. Patient serum is reacted with the virus-infected cell substrate and if antibodies to the EA of EBV are present they will bind to the antigen substrate and not rinse off. Subsequently, when fluoresceinated antihuman IgG is added to the reaction site, it will bind to the IgG antibodies, causing the EA-antibody complex to fluoresce when viewed through the fluorescence microscope.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

The maximum number of tests obtained from this test kit is listed on the outer box.

- EBV-EA Substrate Slides:** With Raji cells from a Burkitt's lymphoma fixed onto each well. Approximately 15 to 25% of the cells express EBV-EA to permit easy reading and optimal contrast. Positive cells are chemically induced in the presence of inhibitors of DNA synthesis to ensure the expression of EBV-EA and prevent the production of infectious EBV virions. Negative cells are Raji cells which have not been chemically induced. The individually packaged slides are ready for use when removed from the foil packets. Slides stored at 2-8 C are stable until the date stated on the slide package. Do not use a slide if the desiccant indicator (line in center of desiccant) has changed from blue to pink.
- Phosphate Buffered Saline (PBS powder):** Rehydrate to 1 liter with distilled water. When rehydrated, the PBS is a 0.01 M phosphate buffer with a pH of 7.5 and contains sodium azide. Rehydrated PBS stored at 2-8 C is stable indefinitely.
- Serum Diluent:** Rehydrate with 20 mL PBS solution. Allow at least 10 minutes for contents to dissolve. Mix thoroughly by inversion before each use. The reconstituted diluent contains caprine proteins and stabilizers and is stable for 6 months at 2-8 C.
- Positive and Negative Control Sera (See WARNINGS step 4):** Lyophilized. Each human control serum is reconstituted with 1 mL PBS to give a 1:10 working dilution. The titer is stated on the label of the Positive Control. The reconstituted sera are stable for 6 weeks at 2-8 C or 8 months at ≤ -20 C.
- Conjugate:** Lyophilized. Fluorescein-labeled antihuman IgG (goat) is reconstituted with 3 mL of PBS. The conjugate contains less than 0.1% Evans blue counterstain and is pretiered for use with each kit. The reconstituted conjugate can be stored up to 2 weeks at 2-8 C or aliquoted and stored up to 8 months at ≤ -20 C. Thawed aliquots should not be refrozen.
- Mounting Fluid:** The mounting fluid, which is a 0.2 M phosphate-buffered glycerol formulation at pH 8.0, is designed to minimize elution of counterstain. It is ready for use.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Serology laboratory supplies: 12 x 75 mm test tubes, test tube rack, serological and Pasteur pipettes
- Volumetric flask, 1 liter
- Wash bottle
- Distilled water
- Staining dish
- Cotton-tipped swabs, absorbent towels
- Moist chamber
- Cover slips, no. 1, 22 x 50 mm
- 37 C Incubator
- Fluorescence microscope. A FITC blue light excitation filter and a 515 nm barrier filter, or any comparable filter system, is suggested for transmitted-light microscopy using a darkfield condenser and for incident-light microscopy using a 500 nm dichroic mirror.

PRECAUTIONS

All reagents are for in vitro diagnostic use only.

WARNINGS

- The conjugate contains Evans Blue dye as a counterstain. This dye may be carcinogenic. Avoid contact with the skin.
- The PBS Powder contains sodium azide, which may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azide compounds. When disposing of reagents through plumbing fixtures, flush with a large volume of water to prevent azide build-up in drains.
- Sodium azide is very toxic in case of ingestion. In contact with acid it emits a very toxic gas. In case of contact with the skin wash immediately and abundantly with water.

- Handle specimens, Controls and the materials that contact them as potential biohazards. The source materials used to prepare the control reagents were tested at the donor level and found to be nonreactive for the antigens or nuclear materials associated with, or antibodies to, the following viruses, as defined by required FDA-licensed tests: Human immunodeficiency viruses Types 1 and 2, Hepatitis B virus and Hepatitis C virus. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, these materials should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended in the CDC/NIH "Biosafety and Microbiological and Biomedical Laboratories".

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

Refer to the SDS, available at www.meridianbioscience.com for Hazards and Precautionary Statements.

SHELF LIFE AND STORAGE

- The entire kit should be stored in the refrigerator (2-8 C).
- The kit is ready for use after reconstitution of reagents.
- If reconstituted conjugate and control sera are to be stored at ≤ -20 C, self-defrosting freezers are not recommended.
- Reagents should not be refrozen once thawed.
- Individual slide packets should remain sealed until just before use.
- Reagents and antigen slides should not be used beyond stated expiration dates.
- If lyophilized reagents show evidence of rehydration, they should not be used.
- Incubation times and temperatures other than those specified may give erroneous results.
- The components of this kit have been tested and standardized as a unit. Use of components from other lots or other manufacturers may yield unsatisfactory results.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Blood obtained aseptically by venipuncture should be allowed to clot at room temperature and then be centrifuged at 1500 x g for 10 minutes at room temperature. The serum should be separated as soon as possible and refrigerated (2-8 C), or stored frozen (≤ -20 C) if not tested within one week. Serum samples should not be repeatedly frozen and thawed. Self-defrosting freezers are not recommended as storage units. The use of sera exhibiting hemolysis, lipemia or microbial growth is not recommended.

Sera should be screened at a 1:10 dilution. The screening dilution must be prepared in Serum Diluent. Sera which are positive at the screening dilution can be titrated using serial two-fold dilutions. The titration dilutions should be made from the 1:10 screening dilution and may be prepared using either Serum Diluent or PBS.

TEST PROCEDURE

- Prepare a 1:10 dilution of the patient serum with Serum Diluent.
- Remove slide from foil packet.
- Using a Pasteur pipette, add just enough appropriately diluted serum (approximately 15 μ L) to cover each reaction site.
- Place the slide in a moist chamber and incubate at 37 C for 30 minutes.
- Rinse slide briefly with a gentle stream of PBS (avoid directing PBS at wells) and then immerse in PBS for 5 minutes.
- Air dry the slide by standing on end on absorbent toweling.
- Wipe between wells with a cotton-tipped swab moistened with distilled water.
- Add just enough conjugate (approximately 15 μ L) to cover each reaction site.
- Incubate the slide at 37 C in a moist chamber for 30 minutes.
- Rinse and dry the slide as described in steps 5 and 6.
- Just before reading, add a sufficient amount of mounting fluid to each well to entirely cover the substrate when the cover slip is applied. Cover with a 22 x 50 mm, no. 1 cover slip.
- NOTE:** Addition of too much mounting fluid may cause excessive movement of the cover slip. Addition of insufficient mounting fluid to a well may make part of the substrate unreadable.
- Read slide at 150X to 200X magnification within 24 hours. Store in the dark until read and then discard.

INTERPRETATION OF RESULTS

The reaction is **POSITIVE** when 15 to 25% of the cells in each field exhibit a yellow to greenish-yellow cytoplasmic or whole cell fluorescence. The remaining cells provide a contrasting red background. The EBV-EA antibody titer is the reciprocal of the highest dilution of serum which produces a 1+ fluorescence. A positive reaction at a dilution of 1:10 indicates the presence of IgG antibody to EBV-EA.

The reaction is **NEGATIVE** when cells do not fluoresce yellow to greenish-yellow but appear red due to the counterstain or exhibit less than a 1+ reaction at the screening dilution. A negative reaction at the 1:10 dilution indicates no detectable IgG antibody to EBV-EA.

Test results for antibodies to EBV-EA should be evaluated in relation to patient symptoms, clinical history, and antibody responses to VCA and NA of EBV to establish a diagnosis. The positive/negative cut-off has been set at the 1:10 dilution as an indicator of the presence of IgG antibody to EBV-EA. It is recognized that the presence of antibody at a titer of 10 is not necessarily related to current symptoms due to infection with EBV. Some normal healthy individuals may have titers of 10.

Some sera produce reactions that cannot be determined to be either positive or negative due to the high levels of non-specific fluorescence (NSF) that they produce. These sera generally cause fluorescence in >50% of the cells at the 1:10 dilution, obscuring the true test reaction. Further dilutions of these sera may alleviate the NSF problem and allow the reading of a **positive** reaction; however, negative reactions at these dilutions cannot be interpreted as a true negative specimen for IgG antibody to EBV-EA since the 1:10 dilution was unreadable. A serum which produces a negative reaction at higher dilutions but is unreadable at the 1:10 dilution due to NSF must be retested using a freshly drawn serum sample or be reported as "indeterminate for IgG to EBV-EA due to NSF".

QUALITY CONTROL

This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.

Each kit contains positive and negative control sera which should be incorporated into each test run.

The Negative Control must exhibit less than a 1+ reaction at the 1:10 working dilution.

The Positive Control serum is titrated to provide a standard for checking test sensitivity. It should exhibit a strong positive reaction at the screening dilution and diminish to a 1+ reaction at its stated titer. A day-to-day variance of one two-fold dilution on either side of the stated titer is considered acceptable performance.

If the test run is invalid because the Positive or Negative Control values do not fall within the limits specified and if the expected control reactions are not observed, repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If the control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor. Test results should not be reported until the condition(s) is corrected.

Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organizations. Refer to Clinical Laboratory Medicine – In Vitro Diagnostic Medical Devices – Validation of User Quality Control Procedures by the Manufacturer (ISO/FDIS 15198) for further guidance regarding Quality Control Practices.

EXPECTED VALUES

In acute primary infections with EBV the IgG response to EA closely follows that to VCA but is more transient, declining to low but detectable levels months or, in some cases, years after an IM episode. Antibody titers to EA tend to be lower than those to VCA, and usually do not exceed 640 with this test. The presence of antibodies to EA concurrent with IgM antibody to VCA is evidence of primary infection; however, antibodies to EA do not occur in approximately 10 to 20% of adults and children with acute IM.¹³

Antibodies to EA are characteristically absent or present in low titer in individuals with latent infections. Immunosuppressed and immunodeficient patients and some persons of advanced age often have high titers of IgG antibodies to both EA and VCA, which most likely can be attributed to reactivation of latent virus.¹⁶

Elevated IgG titers to EA and VCA concurrent with stable levels of antibody to NA is serologic evidence for reactivation of EBV. Fourfold or greater increases in IgG titers to EA and VCA may occur as a nonspecific reactivation of latent virus in some renal transplant patients and AIDS, immunosuppressed or immunodeficient patients.¹³

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- Test results should not be used if nonspecific reactants in the test sample bind to the substrate cells. Nonspecific binding is easily discerned since the staining produced by this reaction involves a majority of the cells whereas specific staining for EBV-EA involves only 15-25% of the cells (those expressing early antigens to EBV). Care must be taken in the interpretation of results when more than 30% of the cells exhibit fluorescence. Under these conditions the positive result must demonstrate the characteristic whole-cell fluorescence present in the positive control as opposed to nonspecific fluorescence that is restricted to only the nucleus or cell membrane.
- Test results for sera with high antibody titers to nuclear antigen of EBV may be difficult to interpret. These sera typically demonstrate a dull yellow nuclear fluorescence in more than 50% of the cells which is not typical of the greenish-yellow cytoplasmic or whole cell fluorescence characteristic of EA. As indicated above, close observation of the characteristic fluorescence staining pattern of the EBV-EA positive control will help in MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test interpretation.
- Fourfold or greater increases in IgG titers to EA and VCA may occur as a nonspecific reactivation of latent virus in some AIDS patients and other immunosuppressed and immunodeficient patients.¹³ Elevated levels of IgG antibody to EBV-EA are frequently noted in patients with Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, and other malignancies.¹⁶
- Endpoint titers in the MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test can vary depending on the type of microscope, light source, filter system, and age of bulb used to read the reactions.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test is a sensitive and rapid method for the qualitative and quantitative determination of IgG antibodies to D and R components of EBV-EA in human serum. The sensitivity of each kit lot is controlled by testing with reference sera to ensure reproducible results from lot to lot. The reproductibility of the MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test was evaluated and found to be within an acceptable range of plus or minus one two-fold dilution. Test results from clinical studies and the testing of reference sera indicate the MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test is specific for antibodies to EA of EBV and does not cross-react with IgG antibodies to the other herpes viruses. Reference sera with EBV-EA specific IgG titers as high as 640 have been tested without evidence of a prozone phenomenon.

ITALIANO

MERIFLUOR[®]

EBV-EA IgG IFA

Test in immunofluorescenza per la ricerca di IgG anti EBV-EA nel siero umano

REF EA101

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

R. Only

FINALITÀ D'USO

Il test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA è basato su una tecnica, rapida e sensibile in immunofluorescenza (IFA) per la ricerca qualitativa e quantitativa di anticorpi anti-antigene precoce (EA) del virus di Epstein-Barr (EBV) nel siero umano. Quando eseguito secondo le istruzioni, il test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA è in grado di rilevare la presenza di IgG dirette contro la frazione diffusa (D) e quella ristretta (R) del complesso EBV-EA. Il test può fornire informazioni aggiuntive per la diagnosi della malattia associata ad EBV.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è un agente infettivo molto diffuso che comunemente causa infezioni nei bambini piccoli, che di solito sono asintomatiche oppure causano problemi di modesta entità. Tuttavia, i soggetti che contraggono l'infezione da EBV in età adulta spesso sviluppano la mononucleosi infettiva. Nel 50% circa dei casi si ha splenomegalia, mentre in una percentuale minore si ha epatomegalia oppure entrambe.¹ L'alterazione della funzionalità epatica è più marcata in corso di mononucleosi da EBV rispetto a quella da CMV ed entrambe queste patologie devono essere prese in considerazione nella diagnosi differenziale di epatite.²

Le infezioni da EBV possono provocare complicanze a carico del Sistema Nervoso, del cuore, degli occhi, dell'apparato respiratorio, del sangue, dell'apparato digerente e renale.³ Le sindromi neurologiche associate comprendono paralisi di Bell, sindrome di Guillain-Barre, meningoencefalite, sindrome di Reye, mielite, neurite dei nervi cranici e disturbi psicotici.^{4,5} Il coinvolgimento bulbare può essere fatale in seguito a paralisi respiratoria progressiva.⁵ Il linfoma di Burkitt, il carcinoma rino-faringeo ed alcune neoplasie del timo, delle parotidi e della laringe sopraglottide sono state associate ad infezione da EBV.^{5,7,8,9}

Come gli altri virus della famiglia Herpesviridae, EBV provoca un'infezione latente.¹⁰ Il genoma virale è localizzato nei linfociti B del sistema linforeticolare e nelle cellule epiteliali della mucosa oro-faringea.¹¹ Le trasfusioni di sangue da un donatore immune ad un paziente non immune provocano un'infezione primaria chiamata sindrome da MI post-trasfusionale.¹² La riattivazione di un'infezione latente è implicata nella forma persistente nota come mononucleosi cronica o infezione cronica da EBV. L'infezione persistente da EBV può essere un cofattore nello sviluppo di AIDS nei soggetti infettati dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV).¹³

L'infezione da EBV è caratterizzata dalla presenza di capside virale (VCA), antigene precoce (EA) e antigene nucleare (NA) e dai rispettivi anticorpi. La produzione di EA avviene nei primi stadi della replicazione virale, prima della sintesi del DNA.¹⁴ Durante la fase acuta della malattia si trovano IgM ed IgG anti-VCA e possono essere presenti IgG anti-EA.⁶ La contemporanea presenza di anticorpi anti-EA e di anticorpi anti-NA indica una riattivazione dell'infezione da EBV.^{13,15} Elevati titoli di IgG anti-VCA ed anti-EA si osservano spesso in pazienti con mononucleosi cronica, negli immunodepressi, ma anche negli anziani in seguito a riattivazione di un'infezione latente da EBV.^{13,16} La persistente presenza di alti titoli anticorpali anti-EA in presenza di anticorpi anti-NA indica una riattivazione dell'infezione oppure un'infezione attiva persistente da EBV.¹³

Il test in immunofluorescenza indiretta (IFA) rappresenta un valido mezzo per la rilevazione della presenza di anticorpi anti-EA di EBV. Il test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA consente di determinare la presenza di anticorpi diretti contro le frazioni D e R di EA, ma non è in grado di differenziare gli anticorpi anti-EA-D da quelli anti-EA-R. Lo screening per evidenziare la presenza di anticorpi diretti contro EA e contro gli altri antigeni di EBV può dare importanti informazioni di carattere diagnostico.

PRINCIPI BIOLOGICI

Il test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA è basato su una tecnica di immunofluorescenza indiretta (IFA). Il siero del paziente in esame viene fatto reagire con il substrato e se nel siero sono presenti anticorpi anti-EA di EBV, essi si legano all'antigene e non vengono rimossi dal lavaggio. Pertanto, quando un siero anti-IgG umano marcato con fluoresceina viene aggiunto nei pozzetti di reazione, esso si lega alle IgG legate all'antigene, cosicché le cellule infettate da EBV risultano fluorescenti quando il vetrino viene esaminato mediante un microscopio a fluorescenza.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

- Vetrini preparati con antigene EA di EBV:** Preparati con cellule di Raji da linfoma di Burkitt fissati su ciascun pozzetto. Circa il 15-25% delle cellule esprime l'antigene virale per permettere una facile lettura ed un'ottimale colorazione di contrasto. Le cellule positive sono indotte chimicamente in presenza di inibitori della sintesi del DNA per assicurare l'espressione di EBV-EA e per impedire la produzione di virioni infettanti. Le cellule negative sono cellule di Raji che non sono state indotte chimicamente. I vetrini, confezionati singolarmente, sono pronti all'uso dopo apertura della confezione. I vetrini non utilizzati sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservati a 2-8 C. Non usare il vetrino se lo stabilizzatore di umidità (linea al centro dello stabilizzatore) è cambiato da blu a rosa.
- Tampone Fosfato (polvere PBS):** Portare a 1 L con acqua distillata. Si ottiene così una soluzione 0.01 M di tampone fosfato, pH 7,5, contenente sodio azide. Se conservato a 2-8 C, il PBS reidratato è stabile indefinitamente.

- Diluente per sieri:** Reidratare con 20 mL di tampone PBS. Lasciar sciogliere il contenuto per almeno 10 minuti. Mescolare bene per inversione prima di ogni utilizzo. Il diluente ricostituito contiene proteine di capra e stabilizzatori e può essere conservato per 6 mesi a 2-8 C.
- Controllo Positivo e Negativo (Vedere AVVERTENZE al punto 4):** Liofilizzato. Ciascun siero di controllo (umano) deve essere ricostituito con 1 mL di PBS per preparare la soluzione di lavoro 1:10. Il titolo anticorpale del Controllo Positivo è stampato sull'etichetta del flaconcino. I sieri di controllo ricostituiti sono stabili per 6 settimane a 2-8 C oppure per 8 mesi a ≤ -20 C.
- Coniugato:** Liofilizzato. Siero (di capra) anti-IgG umano marcato con fluoresceina: deve essere ricostituito con 3 mL di PBS. Il coniugato contiene meno dello 0,1% di Blu di Evans come colorante di contrasto ed è standardizzato per l'uso con ciascun lotto del kit. Il coniugato ricostituito può essere conservato fino a 2 settimane a 2-8 C oppure fino a 8 mesi a ≤ -20 C diviso in aliquote. Una volta scongelate le aliquote non devono essere ricongelate.
- Fluido di montaggio:** Il fluido di montaggio è una soluzione 0,2 M di tampone fosfato-glicerolo, a pH 8,0, formulata per minimizzare l'eluzione del colorante di contrasto. E' pronto all'uso.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Materiale di laboratorio per sierologia: provette 12 x 75 mm, porta provette, pipette per sierologia e pipette Pasteur.
- Beuta da 1 L.
- Spruzzetta per lavaggi.
- Acqua distillata.
- Supporto per colorazioni.
- Tamponi con batuffolo di cotone, tovaglioli assorbenti.
- Camera umida.
- Vetrini coprioggetto, No. 1, 22 x 50 mm.
- Termostato a 37 C.
- Microscopio a fluorescenza. Si consiglia l'uso di filtro di eccitazione FICT a luce blu e di un filtro di barriera a 515 nm, oppure qualsiasi sistema di filtri paragonabile a questo, per la microscopia a luce trasmessa (con condensatore per campo oscuro) e per quella a luce incidente (con specchio dicroico a 500 nm).

PRECAUZIONI

Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.

AVVERTENZE

- Il coniugato contiene Blu di Evans come colorante di contrasto. Tale reagente può essere cancerogeno. Evitare il contatto con la cute.
- La Polvere di PBS contiene sodio azide che può reagire con il piombo o con il rame delle tubature formando azidi metalliche altamente esplosive. Quando si eliminano questi reagenti nelle condutture di scarico bisogna far scorrere molta acqua, per evitare l'accumulo di azide nei tubi.
- Il sodio azide è molto tossica in caso di ingestione. A contatto con acidi emette gas molto tossici. In caso di contatto con la cute, lavare immediatamente ed abbondantemente con acqua.
- Maneggiare campioni, controlli e materiali che possono entrare a contatto con essi come sostanze biologicamente pericolose. I sieri usati per preparare i reagenti di controllo sono stati analizzati a livello del donatore e sono risultati non reattivi per gli antigeni o il materiale nucleare o gli anticorpi in base ai metodi di analisi richiesti dalla FDA per i seguenti virus: HIV-1, HIV-2, Epatite B ed Epatite C. Tuttavia, poiché nessun metodo di analisi può offrire garanzia assoluta dell'assenza di agenti infettivi, questi materiali devono essere maneggiati al Livello di biosicurezza 2, come consigliato nella normativa CDC/NIH "Biosafety and Microbiological and Biomedical Laboratories".

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Fare riferimento alla SDS, disponibile sul sito www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version) per i rischi e i consigli di prudenza.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

- Il kit deve essere conservato in frigorifero (2-8 C).
- Una volta ricostituiti i reagenti, il kit è pronto all'uso.
- Per la conservazione a ≤ -20 C di sei sieri e del coniugato ricostituito si consiglia di non utilizzare congelatori dotati di scongelamento automatico.
- Una volta scongelati i reagenti non devono essere ricongelati.
- Le buste singole contenenti i vetrini devono rimanere sigillate fino al momento dell'uso.
- I reagenti e i vetrini con l'antigene non devono essere usati oltre la data di scadenza.
- Se i reagenti liofilizzati mostrano segni di reidratazione non devono essere utilizzati.
- Tempi e temperature di incubazione diversi da quelli indicati possono dare risultati errati.
- I componenti di questo kit sono stati testati e standardizzati tra loro come parte di un'unità. L'utilizzo di reagenti appartenenti a lotti diversi o preparati da altre ditte può causare risultati insoddisfacenti.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni di sangue raccolti mediante prelievo venoso devono essere lasciati coagulare a temperatura ambiente e quindi centrifugati. Il siero deve essere separato dal coagulo non appena possibile e conservato in frigorifero (2-8 C) oppure congelato (≤ -20 C), se il test non viene eseguito entro una settimana. I campioni non devono essere ripetutamente congelati e scongelati. I congelatori dotati di scongelamento automatico non sono consigliati per la conservazione del siero. L'uso di sieri fortemente lipemici, emolizzati o contaminati da microrganismi può provocare risultati errati, per cui è vivamente sconsigliato.

I sieri devono essere testati ad una diluizione screening di 1:10. Tutte le diluizioni dei campioni devono essere preparate con il Diluente per siero. I sieri risultati positivi alla diluizione screening possono essere ulteriormente diluiti in base 2 e titolati. Le diluizioni per la titolazione devono essere allestite partendo dalla diluizione screening 1:10 e possono essere preparate sia con il Diluente per siero sia con il tampone PBS.

PROCEDURA DEL TEST

- Preparare una diluizione 1:10 del siero del paziente usando il Diluente per siero.
- Togliere il vetrino dalla busta sigillata.
- Usando una pipetta Pasteur, distribuire una quantità di siero diluito (circa 15 μ L) sufficiente a coprire la superficie del pozzetto di reazione.
- Mettere il vetrino nella camera umida ed incubare a 37 C per 30 minuti.
- Lavare brevemente il vetrino con il tampone PBS (evitare di dirigere il getto della spruzzetta direttamente ai pozzetti) e successivamente immergere il vetrino in tampone PBS per 5 minuti.
- Lasciar asciugare il vetrino all'aria, mettendolo in posizione verticale su tovaglioli di carta assorbente.
- Pulire gli spazi tra i pozzetti sul vetrino usando un tampone con la punta di cotone inumidita con acqua distillata.
- Usando una pipetta Pasteur, distribuire una quantità di Coniugato (circa 15 μ L) sufficiente a coprire la superficie del pozzetto di reazione.
- Incubare il vetrino a 37 C in camera umida per 30 minuti.
- Lavare ed asciugare il vetrino come descritto ai punti 5 e 6.
- Appena prima di leggere, distribuire una quantità di Fluido di montaggio in modo che l'intera superficie di ciascun pozzetto ne risulti coperta quando viene messo il vetrino coprioggetto. Coprire il vetrino con un coprioggetto, da 22 x 50 mm.
NOTA: l'aggiunta di una quantità eccessiva di Fluido di montaggio può causare movimenti eccessivi del vetrino coprioggetto. Una quantità insufficiente di Fluido di montaggio può rendere illeggibile una parte del substrato dei pozzetti.
- Leggere il vetrino entro 24 ore, usando gli ingrandimenti 150X e 200X. Conservare i vetrini al buio fino al momento della lettura e poi eliminarli.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La reazione è considerata POSITIVA quando il 15-25% delle cellule in ciascun campo microscopico presentano una fluorescenza gialla o giallo-verdastra a livello citoplasmatico oppure su tutta la cellula. Le altre cellule sono colorate in rosso dal colorante di contrasto. Il titolo di IgG anti-EBV-EA corrisponde al reciproco della massima diluizione del siero che produce una fluorescenza 1+. Se un siero risulta positivo alla diluizione 1:10 o maggiore, ciò indica la presenza di anticorpi anti-EBV-EA.

La reazione è NEGATIVA quando nessuna cellula mostra fluorescenza gialla o giallo-verdastra, ma tutte appaiono colorate in rosso dal colorante di contrasto o mostra una reazione inferiore a 1+ alla diluizione di screening. Un risultato negativo alla diluizione di screening Indica l'assenza di livelli rilevabili di IgG anti-EBV-EA.

Per una diagnosi corretta, i risultati dei test per la ricerca di anticorpi anti-EBV-EA devono essere valutati in base alla sintomatologia, all'anamnesi ed al risultato dei test per la presenza di anticorpi anti-VCA ed anti-NA. Il valore soglia positivo/negativo è stato fissato alla diluizione 1:10, quale indicatore della presenza di IgG anti-EBV-EA. È noto che la presenza di un titolo anticorpale di 10 non è necessariamente legato alla sintomatologia in atto in seguito ad un'infezione da EBV. Alcuni soggetti sani possono avere titoli anticorpali di 10.

Alcuni sieri danno reazioni che non possono essere identificate né come positive né come negative a causa dell'alto livello di fluorescenza aspecifica (NSF). Spesso questi sieri causano una fluorescenza in una percentuale >50% delle cellule alla diluizione 1:10, interferendo con il vero risultato dei test. Ulteriori diluizioni di questi sieri possono eliminare il problema della NSF, consentendo la lettura di un risultato **positivo**; tuttavia, in questi casi non è possibile individuare un campione negativo per la presenza di IgG anti-EBV-EA, poiché la diluizione 1:10 è illeggibile. Un siero con reazione negativa a diluizioni maggiori, ma illeggibile alla diluizione screening 1:10 a causa della NSF, deve essere ritestato prelevando un campione successivo oppure deve essere refertato come: "Presenza di IgG anti-EBV-EA non determinabile causa fluorescenza aspecifica".

CONTROLLO DI QUALITÀ

Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, regionali, nazionali o dagli enti di accreditamento.

Ciascun kit contiene un Controllo Positivo e Negativo che devono essere inclusi ogni volta che si esegue il test.

Il Controllo Negativo deve mostrare una fluorescenza inferiore a 1+ alla diluizione di lavoro 1:10.

Il Controllo Positivo deve essere titolato per dare uno standard di riferimento per valutare la sensibilità del test. Esso dovrebbe mostrare una forte reazione positiva alla diluizione screening che diminuisce fino a raggiungere una positività pari a 1+ in corrispondenza del titolo indicato. Una variazione da un giorno all'altro pari ad una diluizione in base 2 rispetto al titolo indicato (sia in più che in meno) deve essere considerata accettabile.

Se i risultati dei test non sono validi perché il Controllo Positivo o quello Negativo non danno i risultati attesi e se non si ottengono i risultati attesi con i Controlli, come prima opzione per identificare la causa del fallimento, diversi da quelli previsti ed i reagenti non siano scaduti, ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale (Italia +39031433636). Per determinare la causa principale del malfunzionamento sarà necessario innanzitutto ripetere le analisi di controllo.

Ulteriori test possono essere effettuati con controlli addizionali per rispondere alle esigenze delle linee guida o delle normative locali, statali e/o federali e/o delle organizzazioni accreditanti. Per una ulteriore guida sulle pratiche di Controllo Qualità è possibile fare riferimento al manuale ISO "Clinical Laboratory Medicine – In Vitro Diagnostic Medical Devices – Validation of User Quality Control Procedures by the Manufacturer. (ISO/FDIS 15198)".

VALORI ATTESI

Durante la fase acuta dell'infezione primaria da EBV la produzione di IgG anti-EA segue da vicino quella degli anticorpi anti-VCA, ma è meno duratura, diminuendo fino a raggiungere livelli molto bassi, ma ancora rilevabili per mesi o, in alcuni casi, anni dopo un episodio di MI. I titoli anticorpali anti-EA tendono ad essere minori rispetto a quelli anti-VCA e con questo test di solito non superano il valore di 640. La contemporanea presenza di anticorpi anti-EA e di IgM anti-VCA indica un'infezione primaria; tuttavia, gli anticorpi anti-EA non sono rilevabili nel 10-20% degli adulti e dei bambini con MI acuta.¹²

La presenza contemporanea di titoli elevati di IgG anti-EA ed anti-VCA, con livelli stabili di anticorpi anti-NA, rappresenta un marker sierologico di riattivazione dell'infezione da EBV.¹⁵ Un aumento del titolo anticorpale anti-EA ed anti-VCA pari a due o più diluizioni in base 2 può essere conseguenza non specifica di una riattivazione di un'infezione virale latente in alcuni pazienti AIDS e/o in altri pazienti immunodepressi.¹³

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- I risultati dei test non devono essere refertati se si nota la presenza di reazioni aspecifiche. Queste reazioni aspecifiche sono facilmente distinguibili poiché coinvolgono la maggior parte delle cellule del substrato, mentre la fluorescenza specifica data dalla presenza di anticorpi anti-EBV-EA riguarda solo il 15-25% delle cellule (cioè quelle che esprimono gli antigeni precoci di EBV). Bisogna fare molta attenzione nell'interpretare i risultati quando una percentuale >30% delle cellule risulta fluorescente. In questi casi i sieri positivi devono dare la caratteristica fluorescenza su tutta la cellula, osservabile nel Controllo Positivo, ben diversa da quella non specifica che coinvolge solo il nucleo o la membrana cellulare.
- I risultati dei sieri che contengono elevati livelli di anticorpi anti-antigene nucleare di EBV possono essere di difficile interpretazione. Questi sieri di solito mostrano una fluorescenza nucleare gialla opaca in più del 50% delle cellule che è diversa dalla tipica fluorescenza giallo-verdstra a livello citoplasmatico oppure dalla fluorescenza in tutta la cellula caratteristica di EA. Come nel caso precedente, anche qui l'osservazione accurata del tipo di fluorescenza del Controllo Positivo per EBV-EA consente la corretta interpretazione dei risultati del test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA.
- Un aumento del titolo anticorpale anti-EA ed anti-VCA pari a due o più diluizioni in base 2 può essere conseguenza non specifica di una riattivazione di un'infezione virale latente in alcuni pazienti AIDS e/o in altri pazienti immunodepressi.¹³ Titoli elevati di IgG anti-EBV-EA possono essere osservati in pazienti affetti da linfoma di Burkitt, carcinoma rino-faringeo ed altre complicitanze maligne.¹⁶
- I titoli anticorpali ottenuti con il test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA possono variare a seconda del tipo di microscopio, della fonte di luce, dell'età della lampada e del sistema di filtri utilizzati per la lettura del test.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Il test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA è un metodo rapido e sensibile per la rilevazione qualitativa e quantitativa della presenza di IgG dirette contro le frazioni D e R di EBV-EA nel siero umano. La sensibilità di ciascun lotto di prodotto è controllata mediante sieri di riferimento per assicurare che i risultati siano riproducibili. La riproducibilità del test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA è stata dimostrata essere compresa entro un range accettabile di una diluizione in base due. I risultati di alcuni studi clinici e quelli ottenuti con sieri di riferimento indicano che il test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA è specifico per gli anticorpi anti-EA di EBV e non presenta cross-reazioni con anticorpi diretti contro altri virus della famiglia Herpesviridae. I test eseguiti su sieri di riferimento contenenti IgG specifiche anti-EBV-EA a titoli pari anche a 640 non hanno mostrato evidenza di fenomeni di prozona.

FRANÇAIS

MERIFLUOR®
EBV-EA IgG IFA

Test d'immunofluorescence pour la détection des anticorps IgG dirigés contre l'EBV-EA dans le sérum humain

REF EA101

IVD

Dispositif médical de diagnostic in vitro

R. Only

BUT DE LA METHODE

Le test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA est une méthode d'immunofluorescence sensible et rapide pour la détection qualitative et quantitative des anticorps dirigés contre l'antigène précoce (EA pour *Early Antigen*) du virus d'Epstein-Barr (EBV) dans le sérum humain. Lorsqu'il est effectué suivant les instructions, le test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA détecte les anticorps IgG dirigés contre les composantes diffuse (D) et restreinte (R pour Restricted) du complexe EBV-EA. Il permet d'apporter une information complémentaire au diagnostic des maladies associées à l'EBV.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Le virus EBV est un pathogène humain largement répandu, causant généralement des infections dans la petite enfance entraînant une maladie asymptomatique ou bénigne. Les individus contractant une infection à EBV au début de l'âge adulte développent fréquemment une mononucléose infectieuse (MI) classique. Approximativement la moitié des patients atteints de MI développe une splénomégalie, un plus faible pourcentage développe une hépatomégalie ou les deux.¹ Le dysfonctionnement du foie est plus marqué dans la mononucléose à EBV que dans la mononucléose associée au CMV, et ces deux maladies doivent être prises en compte dans le diagnostic différentiel d'une hépatite.²

Les infections à EBV peuvent entraîner des complications impliquant les systèmes neurologique, cardiaque, oculaire, respiratoire, hémotologique, digestif et rénal.³ Les syndromes neurologiques associés comprennent la paralysie de Bell, le syndrome de Guillain-Barré, la méningoencéphalite, le syndrome de Reye, la myélite, la névrite du nerf crânien et des désordres psychotiques.^{4, 5} L'implication du bulbe et la paralysie respiratoire qui s'ensuit peuvent être fatales.⁵ Le lymphome de Burkitt, le carcinome naso-pharyngien et les néoplasies du thymus, de la glande parotite et du larynx supraglottique ont également été associés à des infections à EBV.^{6,7,8,9}

Comme d'autres herpétovirus, l'EBV établit une infection latente.¹⁰ Son génome réside dans les cellules B du système lymphoréticulaire et les cellules épithéliales de l'oropharynx.¹¹ Une transfusion sanguine d'un donneur immunisé à un receveur non immunisé peut provoquer une primo-infection chez le receveur connue sous le nom de syndrome MI post-transfusionnel.¹² La réactivation d'une infection latente a été impliquée dans une maladie persistante connue sous le nom de mononucléose chronique ou infection à EBV chronique. Une infection persistante à EBV peut être constitutive d'un cofacteur du développement du SIDA chez les individus asymptomatiques infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).¹³

L'infection à EBV entraîne l'expression de l'antigène de la capsid virale (VCA pour *Viral Capsid Antigen*), de l'antigène précoce (EA pour *Early Antigen*) et de l'antigène nucléaire (NA pour *Nuclear Antigen*) avec les réponses en anticorps correspondantes. La synthèse de l'EA a lieu au début de la réplication virale, avant la synthèse d'ADN.¹⁴ Au cours de la phase aiguë de la maladie, les anticorps IgM et IgG anti-VCA sont présents et les anticorps IgG anti-EA peuvent être présents.⁶ La présence d'anticorps anti-EA ainsi que anti-NA permet de diagnostiquer une réactivation de l'infection à EBV.^{13, 15} Des taux élevés d'IgG anti-EA et VCA sont retrouvés fréquemment chez des patients atteints de mononucléose chronique, et chez des patients âgés ou immunodéprimés lors de la réactivation d'une infection à EBV latente.^{13, 16} Une réponse élevée persistante en anticorps anti-EA, en présence d'anticorps anti-NA, est une caractéristique sérologique indiquant une réactivation ou une infection active persistante par l'EBV.¹³

La technique d'immunofluorescence indirecte (IFA pour *Indirect Fluorescent Antibody*) est une méthode sérologique permettant de déterminer le statut immunitaire par rapport à l'EBV-EA. Le test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA détecte les anticorps dirigés contre les composantes D et R de l'EA, mais n'a pas pour but de différencier les anticorps associés à ces antigènes. Le dépistage de la présence d'anticorps dirigés contre l'EA et contre d'autres antigènes associés à l'EBV peut fournir une information diagnostique importante.

PRINCIPE DU TEST

Le test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA utilise la méthode d'immunofluorescence indirecte (IFA). Le sérum du patient réagit avec un substrat de cellules infectées par le virus. Les anticorps anti-EBV-EA éventuellement présents dans le sérum du patient se lient au substrat antigénique et ne sont pas éliminés lors du rinçage. Lorsqu'un anticorps anti-IgG humaine marqué à la fluorescéine est ajouté au site réactionnel, il se lie aux anticorps IgG et provoque une fluorescence du complexe EA-anticorps qui peut être observée au microscope à fluorescence.

MATÉRIEL FOURNI

Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boîte.

- Lames EBV-EA (substrat):** Recouvertes de cellules Raji d'un lymphome de Burkitt fixées sur chaque puits. Environ 15 à 25% des cellules expriment l'EBV-EA, procurant une lecture aisée et un contraste optimal. Les cellules positives sont induites chimiquement en présence d'inhibiteurs de la synthèse d'ADN pour assurer l'expression de l'EBV-EA et empêcher la production de virus EBV infectieux. Les cellules négatives sont des cellules de Raji qui n'ont pas été chimiquement induites. Les lames emballées individuellement sont prêtes à l'emploi dès l'ouverture de l'emballage. Conservées à 2-8 C, elles sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. Ne pas utiliser de lame si l'indicateur de l'agent dessiccant (voir ligne au centre du sachet dessiccant) a viré du bleu au rose.
- Tampon phosphate salin (poudre PBS):** Dissoudre dans 1 litre d'eau distillée. La solution finale est un tampon phosphate 0,01 M à pH 7,5 et contient de l'azide de sodium. Le PBS réhydraté et conservé à 2-8 C est stable indéfiniment.
- Diluant pour sérums:** Resuspendre dans 20 mL de solution de PBS. Laisser le contenu se dissoudre pendant 10 minutes, au moins. Avant chaque utilisation, mélanger soigneusement par inversion. Le diluant reconstitué contient des protéines de chèvre et des stabilisateurs. Il est stable 6 mois à 2-8 C.
- Sérums de contrôle positif et négatif (Voir point 4 sous la rubrique ATTENTION):** Lyophilisés. Chaque sérum de contrôle humain est à reconstituer avec 1 mL de PBS pour donner une dilution de travail 1:10. Le titre est indiqué sur l'étiquette du contrôle positif. Les sérums reconstitués sont stables 6 semaines à 2-8 C ou 8 mois à ≤ -20 C.
- Conjugué:** Lyophilisé. Anticorps de chèvre anti-IgG humaine marqué à la fluorescéine à reconstituer avec 3 mL de PBS. Le conjugué contient moins de 0,1% de bleu Evans (contre-colorant) et est pré-titré pour l'utilisation avec chaque coffret. Le conjugué reconstitué peut être conservé 2 semaines à 2-8 C ou être aliquoté et conservé 8 mois à ≤ -20 C. Les aliquots dégelés ne doivent pas être recongelés.
- Liquide de montage:** Le liquide de montage est une formulation glycérol phosphate tamponnée 0,2 M à pH 8,0, conçue de façon à minimiser l'éluition du contre-colorant. Il est prêt à l'emploi.

MATÉRIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Matériel de laboratoire de sérologie: tubes à essai 12 x 75 mm, portoir, pipettes sérologiques et pipettes Pasteur.
- Ballon jaugé de 1 litre.
- Bouteille de lavage.
- Eau distillée.
- Bac de coloration.
- Coton-tige, papier absorbant.
- Chambre humide.
- Lamelles couvre-objet, (épaisseur 1), 22 x 50 mm.
- Etuve à 37 C.
- Microscope à fluorescence. Un filtre à excitation à lumière bleue ITCF (isothiocyanate de fluorescéine) et un filtre barrière de 515 nm, ou tout système de filtre comparable, est recommandé pour la microscopie à lumière transmise utilisant un condensateur à champ sombre et pour la microscopie à lumière incidente utilisant un miroir dichroïque de 500 nm.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.

ATTENTION

- Le conjugué contient du bleu Evans comme contre-colorant. Ce colorant peut être cancérigène. Éviter le contact avec la peau.
- La poudre de PBS contient de l'azide de sodium pouvant réagir avec le plomb ou le cuivre pour former des composés d'azide de métal hautement explosifs. Pour l'évacuation des réactifs dans les canalisations, rincer à grandes eaux afin d'éviter la formation d'azide dans les tuyaux.
- L'azide de sodium est très toxique en cas d'ingestion. Au contact d'un acide, il dégage un gaz très toxique. En cas de contact avec la peau, laver immédiatement et abondamment à l'eau.
- Manipuler les échantillons, les contrôles et tout équipement qui les touche comme s'ils présentaient un danger biologique potentiel. Les matières premières utilisées pour la préparation des réactifs de contrôles ont été testées au niveau du donneur et, selon les méthodes d'analyse requises et approuvées par la FDA, jugées non réactives pour les antigènes ou anticorps, associés ou vis-à-vis des virus suivants: le virus de l'immunodéficience humaine VIH-1 et VIH-2, l'hépatite B, l'hépatite C. Cependant, comme aucune méthode d'analyse ne peut offrir l'assurance définitive que les agents infectieux sont absents du produit, ceux-ci doivent être manipulés selon le niveau 2 de sécurité biologique comme recommandé par la *Biosafety and Microbiological and Biomedical Laboratories* du CDC/NIH.

DANGER ET MISES EN GARDE

Pour les dangers et les précautions à prendre, se référer à la fiche de sécurité, disponible sur le site web de Meridian Bioscience. ([www.meridianbioscience.com] (US version) / www.meridianbioscience.eu] (EU version))

DURÉE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

- Le coffret complet doit être stocké au réfrigérateur (2-8 C).
- Le coffret est prêt à l'emploi après reconstitution des réactifs.
- Une fois reconstitués, le conjugué et les sérums de contrôle doivent être conservés à ≤ -20 C. Les congélateurs auto-dégivrants ne sont pas recommandés.
- Une fois décongelés, les réactifs ne devraient pas être recongelés.
- Les emballages des lames individuelles ne doivent être ouverts qu'au moment de leur utilisation.
- Les réactifs et les lames d'antigène ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption.
- Ne pas utiliser des réactifs lyophilisés montrant des signes de réhydratation.

- Des temps d'incubation et des températures autre que ceux spécifiés peuvent causer des résultats erronés.
- Les composants de ce coffret ont été testés et standardisés dans leur ensemble. L'utilisation de réactifs provenant d'autres lots ou d'autres fabricants peut être à l'origine de mauvais résultats.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Laisser coaguler le sang, obtenu par ponction veineuse à température ambiante, puis centrifuger à 1500 g pendant 10 minutes à température ambiante. Le sérum doit être séparé le plus rapidement possible et réfrigéré (2-8 C) ou congelé à (< -20 C) s'il n'est pas testé dans la semaine. Les échantillons de sérum ne doivent pas être congelés et décongelés plusieurs fois. Les congélateurs auto-dégivrants ne sont pas recommandés en tant qu'unités de stockage. L'utilisation de sérums hémolysés, lipémiques ou présentant une croissance microbienne n'est pas recommandée.

Les sérums doivent être testés à la dilution de dépistage 1:10. La dilution de dépistage doit être préparée dans le diluant pour sérums. Les sérums positifs à la dilution de dépistage peuvent être titrés au moyen de dilutions successives de 2 en 2. Les dilutions de titration doivent être réalisées à partir de la dilution de dépistage 1:10 et peuvent être préparées en utilisant soit le diluant pour sérums, soit le PBS.

PROCEDURE DE TEST

- Préparer une dilution au 1:10 des sérums des patients dans le diluant pour sérums.
- Retirer la lame de son emballage.
- Ajouter, à l'aide d'une pipette Pasteur, suffisamment de sérum dilué (environ 15 µL) pour couvrir chaque site de réaction.
- Placer la lame en chambre humide et incubé 30 minutes à 37 C.
- Rincer la lame brièvement avec un léger flux de PBS (éviter de diriger le flux de PBS directement sur les puits), puis l'immerger 5 minutes dans le PBS.
- Laisser sécher la lame à l'air ambiant en la plaçant verticalement sur du papier absorbant.
- Essuyer entre les puits avec un coton-tige humidifié à l'eau distillée.
- Ajouter suffisamment de conjugué (environ 15 µL) pour couvrir chaque site de réaction.
- Incuber la lame en chambre humide, 30 minutes à 37 C.
- Rincer et sécher la lame comme décrit aux points 5 et 6.
- Juste avant la lecture, déposer suffisamment de liquide de montage dans chaque puits afin de couvrir entièrement le substrat lorsqu'on applique la lamelle couvre-objet. Couvrir avec une lamelle couvre-objet, 22 x 50 mm, (épaisseur 1).
- N.B.:** L'addition d'un excès de liquide de montage peut causer un mouvement excessif de la lamelle couvre-objet. L'addition d'une quantité insuffisante de liquide de montage peut empêcher la lecture d'une partie du substrat.
- Lire la lame dans les 24 heures au grossissement 150-200X. Conserver à l'obscurité jusqu'à la lecture puis mettre de côté.

INTERPRETATION DES RESULTATS

La réaction est POSITIVE lorsque 15-25% des cellules dans chaque champ présentent une coloration jaune à jaune-verdâtre du cytoplasme ou de toute la cellule. Les autres cellules constituent un fond rouge contrastant. Le titre des anticorps EBV-EA est l'inverse de la plus haute dilution de sérum produisant une fluorescence 1+. Une réaction positive à la dilution 1:10 indique la présence d'anticorps IgG anti-EBV-EA.

La réaction est NEGATIVE lorsque les cellules ne donnent pas de fluorescence jaune à jaune-verdâtre mais présentent une coloration rouge due au contre-colorant ou présente une très faible fluorescence (< 1+) à la dilution de dépistage. Une réaction négative à la dilution 1:10 indique une absence d'anticorps IgG anti-EBV-EA détectables.

Pour établir un diagnostic, les résultats des tests pour les anticorps anti-EBV-EA doivent être interprétés en relation avec les symptômes du patient, l'historique clinique et les réponses en anticorps anti-EBV-VCA et anti-EBV-NA. La limite du seuil positif/négatif a été établie à la dilution 1:10 pour la présence d'anticorps IgG anti-EBV-EA. Il est admis que la présence d'anticorps à un titre de 10 n'est pas nécessairement liée à des symptômes en cours dus à une infection par l'EBV. Certains individus sains peuvent présenter un titre de 10.

Certains sérums présentent des réactions qui ne peuvent être interprétées comme positives ou négatives, étant donné le niveau élevé de fluorescence non spécifique (FNS) qu'ils produisent. Ces sérums provoquent généralement une fluorescence dans plus de 50% des cellules à la dilution 1:10, dissimulant la véritable réaction du test. Des dilutions complémentaires de ces sérums peuvent partiellement résoudre ce problème de FNS et permettre la lecture d'une réaction positive. Les réactions négatives à ces dilutions ne peuvent toutefois être interprétées comme réellement négatives pour les anticorps IgG anti-EBV-EA, puisque la dilution 1:10 n'était pas lisible. Un tel sérum (produisant une réaction négative à des dilutions supérieures mais étant ininterprétable à la dilution 1:10 à cause de FNS) doit être retesté en utilisant un échantillon de sérum fraîchement prélevé ou être rapporté comme "indéterminé pour les anticorps IgG anti-EBV-EA à cause de FNS".

CONTROLE DE QUALITE

Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.

Chaque coffret contient un sérum de contrôle positif et un sérum de contrôle négatif, qui doivent être incorporés dans chaque série de tests.

Le Contrôle Négatif doit tout au plus montrer une très faible réaction (< 1+) à la dilution de travail de 1:10.

Le sérum de Contrôle Positif est titré pour fournir un standard permettant de vérifier la sensibilité du test. Il doit présenter une réaction fortement positive à la dilution de dépistage et diminuer jusqu'à une réaction 1+ au titre annoncé. Une variation inter-série d'un facteur de dilution deux de part et d'autre du titre annoncé est considérée comme acceptable.

Si le test n'est pas valide parce que les valeurs des Contrôles Positif ou Négatif ne sont pas comprises dans les limites spécifiées et si les réactions attendues ne sont pas observées, la première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée. Les résultats du test ne doivent pas être rapportés tant que les conditions ne sont pas corrigées. La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle.

Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux directives ou requêtes des réglementations locale, départementale ou nationale ou d'organismes accrédités. Pour plus d'indications concernant les pratiques de contrôle de qualité, se référer au document "Clinical Laboratory Medicine – In Vitro Diagnostic Medical Devices – Validation of User Quality Control Procedures by the Manufacturer (ISO/FDIS 15198)".

VALEURS ATTENDUES

Dans les cas d'infection primaire aiguë à EBV, la réponse IgG dirigée contre l'EA suit de façon rapprochée celle dirigée contre le VCA. Elle est cependant plus transitoire et diminue jusqu'à des niveaux faibles mais encore détectables, des mois ou parfois des années après un épisode de MI. Les titres des anticorps anti-EA tendent à être plus faibles que ceux des VCA et n'excèdent en général pas 640 dans ce test. La présence simultanée d'anticorps anti-EA avec des anticorps IgM anti-VCA constitue la preuve qu'il s'agit d'une infection primaire. Les anticorps anti-EA n'apparaissent toutefois pas chez environ 10-20% des adultes et des enfants présentant une MI aiguë.¹³

Les anticorps anti-EA sont de façon caractéristique absents ou présents à des titres faibles chez les individus présentant des infections latentes. Les patients immunodéprimés ou immunodéficients, et certaines personnes âgées, ont souvent des titres élevés d'anticorps IgG anti-EA et anti-VCA, qui peuvent très probablement être attribués à une réactivation du virus latent.¹⁶

Des titres élevés d'IgG anti-EA et anti-VCA en même temps que des taux stables d'anticorps anti-NA constituent une preuve sérologique de la réactivation de l'EBV. Des augmentations d'un facteur quatre ou plus des titres d'IgG anti-EA et anti-VCA peuvent se rencontrer, suite à une réactivation non spécifique du virus latent, chez certains patients ayant subi une transplantation rénale, atteints du SIDA, immunodéprimés ou immunodéficients.¹³

LIMITES DU TEST

- Les résultats du test ne doivent pas être pris en compte si des réactants non spécifiques de l'échantillon à tester se fixent au substrat cellulaire. La liaison non spécifique se distingue aisément dans la mesure où la coloration induite par cette réaction implique la majorité des cellules, alors que la coloration spécifique de l'EBV-EA ne concerne que 15 à 25% des cellules (celles exprimant l'antigène précoce de l'EBV). Une attention particulière doit être portée lors de l'interprétation des résultats lorsque plus de 30% des cellules montrent une fluorescence. Dans ces conditions, un résultat positif doit présenter une fluorescence caractéristique de la totalité de la cellule, comme dans le contrôle positif, par opposition à une fluorescence non spécifique limitée au seul noyau ou à la membrane cellulaire.
- Pour des sérums présentant un titre élevé d'anticorps dirigés contre l'antigène nucléaire de l'EBV, les résultats du test peuvent être difficiles à interpréter. Ces sérums montrent typiquement une fluorescence jaune sombre du noyau dans plus de 50% des cellules, qui n'est pas typique de la fluorescence jaune verdâtre du cytoplasme ou de la fluorescence de la cellule entière caractéristique des EA. Comme mentionné ci-dessus, une observation rigoureuse de l'image caractéristique de la fluorescence du contrôle positif EBV-EA aidera à l'interprétation du test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA.
- Une augmentation d'un facteur quatre ou plus des titres d'IgG anti-EA et VCA peut se produire suite à une réactivation non spécifique du virus latent chez certains patients atteints du SIDA et d'autres patients immunodéprimés et immunodéficients.¹³ Des taux élevés en anticorps IgG anti-EBV-EA sont fréquemment relevés chez des patients atteints du lymphome de Burkitt, du carcinome naso-pharyngien et d'autres tumeurs.¹⁶
- Les titres finals du test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA peuvent varier en fonction du type de microscope, de la source de la lumière, du système de filtre et de l'âge de l'ampoule utilisés pour lire les réactions.

PERFORMANCES DU TEST

Le test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA est une méthode sensible et rapide pour la détermination qualitative et quantitative des anticorps IgG dirigés contre les composantes D et R de l'EBV-EA dans le sérum humain. La sensibilité de chaque lot de coffrets est contrôlée en analysant des sérums de référence de façon à assurer la reproductibilité des résultats d'un lot à l'autre. La reproductibilité du test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA a été évaluée et trouvée comme étant dans un intervalle acceptable de plus ou moins un facteur de dilution deux. Les résultats des tests d'études cliniques et l'analyse de sérums de référence indiquent que le test MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA est spécifique pour les anticorps anti-EBV-EA et ne présente pas de réaction croisée avec les anticorps IgG des autres herpétovirus. Des sérums de référence présentant des titres en IgG spécifiques de l'EBV-EA allant jusqu'à 640 ont été testés sans aucune preuve d'effet prozone.

ESPANOL

MERIFLUOR®

EBV-EA IgG IFA

Método de inmunofluorescencia para anticuerpos IgG contra el AP-VEB en suero humano

REF EA101

IVD Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

Rx Only

USO INDICADO

La prueba de IFI para detectar anticuerpos de tipo IgG contra el AP-VEB (MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA) es un método de inmunofluorescencia rápido y sensible para la detección cualitativa y cuantitativa en suero humano de anticuerpos contra el antígeno precoz (AP) del Virus Epstein-Barr (VEB). Cuando la prueba es realizada de acuerdo con las instrucciones que aquí se presentan, la prueba de MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA contra el AP-VEB detecta anticuerpos de tipo IgG contra los componentes difuso (D) y restricto (R) del complejo AP-VEB. Este hallazgo proporciona información que da soporte para el diagnóstico de la enfermedad asociada con el VEB.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La patogenidad del Virus de Epstein Barr en los humanos está ampliamente diseminada, y por lo general es causa de infección en etapas tempranas de la infancia. Los individuos que contraen infección con el VEB durante la adolescencia con frecuencia desarrollan un cuadro clásico de mononucleosis infecciosa (MI). Aproximadamente un 50% de los pacientes con MI desarrollan esplenomegalia, y sólo un pequeño porcentaje desarrolla hepatomegalia o las dos.¹ Las alteraciones de la función hepática son más marcadas en la MI asociada con el VEB que en la asociada con el citomegalovirus humano (CMV), y las dos infecciones deben ser consideradas en el diagnóstico diferencial de la hepatitis.²

Las infecciones con el VEB pueden traer como resultado complicaciones asociadas con el sistema neurológico, cardíaco, ocular, respiratorio, hematológico, digestivo y renal.³ Entre los síndromes neurológicos asociados se encuentran la parálisis de Bell, el síndrome de Guillain-Barré, la meningoencefalitis, el síndrome de Reye, la mielitis, la neuritis del nervio craneal y los desórdenes psicóticos.^{4,5} El compromiso bulbar seguido de parálisis respiratoria puede ser fatal.⁵ El linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo y las neoplasias del timo, de la glándula parótida y de la laringe supraglótica también han sido asociadas con infecciones causadas por el VEB.^{6,7,8,9}

Al igual que los demás virus de la familia del herpes, el VEB establece una infección latente.¹⁰ El genoma reside en los linfocitos B del sistema linfocítico y en las células epiteliales de la orofaringe.¹¹ La transfusión de sangre obtenida a partir de un donador inmune y administrada a uno no inmune puede producir una infección primaria en el receptor la cual se conoce con el nombre de síndrome de mononucleosis infecciosa post-perfusión.¹² La reactivación de una infección latente ha sido asociada con síntomas de enfermedad permanente, conocida con el nombre de mononucleosis crónica o de infección crónica por el VEB. La infección persistente por el VEB es posible que esté relacionada con el desarrollo del SIDA en individuos asintomáticos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).¹³

La infección con el VEB trae como resultado la expresión del antígeno de cápsida vírico (ACV), del antígeno precoz (AP) y del antígeno nuclear (AN), seguida de la producción de anticuerpos contra los mismos. El AP es sintetizado al comienzo de la replicación viral, antes de la síntesis del ADN.¹⁴ Durante el curso de una infección aguda se pueden encontrar anticuerpos de tipo IgG e IgM contra el ACV y también de tipo IgG contra el AP.⁵ La presencia conjunta de anticuerpos contra el AP y el AN ayuda a establecer la presencia de una reactivación de la infección con el VEB.^{13,15} Los niveles elevados de IgG contra el AP y el ACV ocurren con frecuencia en pacientes con mononucleosis crónica y en pacientes inmunosuprimidos o en pacientes en edad avanzada después de la reactivación de una infección latente por el VEB.^{13,16} La persistencia de niveles elevados de anticuerpos contra el AP, en presencia de anticuerpos contra el AN es una característica del perfil serológico indicativo de una reactivación o de infección activa persistente por el VEB.¹³

La técnica indirecta para detectar anticuerpos inmunofluorescentes (IFI) constituye un procedimiento serológico muy útil para la determinación de la presencia de anticuerpos contra el AP del VEB. La prueba de MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA de tipo IgG contra el AP del VEB detecta anticuerpos contra los componentes D y R del AP sin intentar diferenciar el uno del otro. El examen masivo de la población para detectar la presencia de anticuerpos contra el AP y contra otros antígenos asociados con el VEB puede proporcionar información diagnóstica importante.

PRINCIPIOS BIOLOGICOS

El método de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es utilizado en la prueba de MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA para detectar IgG contra el VEB. El suero del paciente se pone a reaccionar con sustrato de células infectadas con virus, y en caso de que los anticuerpos contra el AP del VEB se encuentren presentes, éstos se unirán al sustrato antigénico y no serán enjuagados. Posteriormente, cuando la IgG anti-humana conjugada con fluoresceína es añadida en el lugar del punto de enlace, ésta se unirá a los anticuerpos de tipo IgG ocasionando que el complejo AP-anticuerpo fluoreszca cuando éste es observado bajo un microscopio fluorescente.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

El número máximo de pruebas que se puede obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.

- Láminas de substrato AP-VEB (EBV-EA):** Recubiertos con células Raji provenientes de un linfoma de Burkitt, fijadas en cada uno de los diez pozos. Aproximadamente, 15-25% de las células fijadas expresan el AP-VEB para facilitar su lectura y permitir un contraste óptimo. Las células positivas son inducidas por medio de un proceso químico en presencia de inhibidores de la síntesis de ADN, lo cual asegura la expresión del AP-VEB y previene la producción de viriones infecciosos. Las células negativas están constituidas por células Raji las cuales no han sido inducidas. Las láminas empacadas individualmente están listas para ser usadas tan pronto como removidas de los paquetes de papel aluminio. Las láminas almacenadas entre 2-8 C son estables hasta la fecha descrita en el empaque de la lámina. No use la lámina si el indicador del desecante (línea en el centro del desecante) ha cambiado de azul a rosa.
- Tampón Salino Fosfato (PBS pulverizado):** Rehidrate el polvo con agua destilada hasta alcanzar un volumen total de 1 litro. El PBS rehidratado tiene una concentración de 0.01 M, un pH de 7,5 y contiene azida de sodio. El tampón de PBS rehidratado almacenado a una temperatura entre los 2-8 C es estable durante tiempo indefinido.
- Diluyente de suero:** Rehidrate con 20 mL de solución de PBS, y deje reposar durante por lo menos 10 minutos para lograr la disolución completa de los componentes. Mezcle completamente por inversión antes de cada uso. El reconstituyente diluido contiene proteínas caprinas y estabilizadores, y es estable durante seis meses a una temperatura entre 2-8 C.
- Sueros Controles Positivo y Negativo (Vea Advertencia Paso 4):** Liofilizado. Cada suero control humano es reconstituido con 1 mL de PBS, lográndose una concentración final de trabajo de 1:10. El título del Control Positivo está escrito en el rótulo del mismo. Los sueros reconstituidos son estables durante seis semanas a una temperatura entre 2-8 C, o durante ocho meses a ≤ -20 C.
- Conjugado:** Liofilizado Anticuerpo IgG anti-humano (cabra) marcado con Fluoresceína, la cual debe reconstituirse con 3 mL de PBS. El conjugado contiene menos de 0,1% de azul de Evans (colorante de contraste), el cual ya viene pre-titulado para usar con cada kit. El conjugado reconstituido puede ser almacenado hasta por dos semanas entre 2-8 C, o de otro modo puede ser alicuotado y almacenado hasta por ocho meses a ≤ -20 C. Las alicuotas descongeladas no deberán volver a congelarse.
- Líquido de montaje:** Solución 0,2 M de glicerol disueltos en tampón fosfato, formulado a un pH de 8,0 para minimizar la elución del colorante de contraste. Viene listo para usar.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO PROPORCIONADOS

- Materiales de laboratorio para serología: tubos de ensayo de 12 x 75 mm, gradilla para tubos, pipetas serológicas y de Pasteur
- Balón volumétrico con capacidad de 1 litro
- Botella para poner el PBS de lavado
- Agua destilada
- Recipiente para tinción
- Hisopos de algodón y toallas de papel absorbente
- Cámara húmeda
- Cubreobjetos No. 1 de 22 x 50 mm
- Incubadora a 37 C
- Microscopio de fluorescencia. Un filtro de excitación de luz azul para FITC, y un filtro de barrera de 515 nm (o cualquier otro sistema de filtros comparables) es sugerido para microscopía de luz transmitida usando un condensador de campo oscuro, y para microscopía de luz incidente utilizando un espejo dicróico de 500 nm.

PRECAUCIONES

Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.

ADVERTENCIA

- El conjugado contiene azul de Evans como colorante de contraste. Este colorante puede ser carcinógeno, por lo tanto evite que éste entre en contacto con la piel.
- El pulverizado del tampón salino fosfato (PBS) contiene Azida de Sodio, la cual puede reaccionar con tuberías de cobre o de plomo y formar compuestos altamente explosivos de azidas metálicas. Al desechar los reactivos a través de tuberías, enjuague con cantidades copiosas de agua para prevenir que se formen depósitos de azidas en los desagües.
- La Azida de Sodio es bastante tóxica al ser ingerida. Al entrar en contacto con ácido, la azida emite un gas que resulta muy tóxico. En caso de que la piel llegue a entrar en contacto con esta azida, enjuéguela inmediatamente con agua en abundancia.
- Maneje las muestras, controles y materiales que entran en contacto con estos como si fueran material biológico potencialmente nocivo. El material que se usa para preparar el reactivo de control son probados a nivel del donante y fueron encontrados no reactivos para antígenos o materia nuclear asociada con, o anticuerpos a, los siguientes virus, según definido por licencia requerida de FDA: Virus humanos de inmunodeficiencia Tipo 1 y 2, virus de Hepatitis B y Hepatitis C. No obstante, y puesto que ningún método puede ofrecer seguridad absoluta de la ausencia de agentes infecciosos, estos materiales deberían manejarse al Nivel de Seguridad Biológica 2, como lo recomiendan los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de los Estados Unidos de Norteamérica en "Biosafety and Microbiological and Biomedical Laboratories" (Seguridad biológica y laboratorios microbiológicos y biomédicos).

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

Se debe referir a los SDS, disponibles en www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version), para las Frases de Peligro y Precaución.

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

- Todos los componentes del kit deberán ser almacenados dentro del refrigerador a una temperatura entre los 2-8 C.
- El kit está listo para ser usado después de reconstituir los reactivos.
- En caso de que el conjugado y el suero control reconstituidos vayan a ser almacenados a ≤ -20 C, no es recomendable el uso de congeladores con descongelación automática.
- Una vez descongelados, los reactivos no deberán volver a congelarse.
- Los paquetes individuales de láminas deberán mantenerse sellados hasta el momento justo antes de usarse.
- Tanto los reactivos como las láminas con antígeno no deberán usarse después de la fecha de expiración descrita.
- En caso de que los reactivos liofilizados muestren signos de rehidratación, éstos no deberán ser usados.
- Tiempos de incubación y temperaturas diferentes a los especificados pueden ocasionar resultados erróneos.
- Los componentes de este kit han sido evaluados y estandarizados como una unidad. El uso de componentes pertenecientes a otros lotes, o a otros fabricantes puede producir resultados insatisfactorios.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de sangre obtenidas por venipunción con técnica aséptica deberán dejarse coagular a temperatura ambiente, y luego deberán ser centrifugadas a 1500 xg durante 10 minutos. El suero deberá ser separado tan pronto sea posible y luego refrigerado a una temperatura entre 2-8 C, o congelado a ≤ -20 C en caso de no ser examinado en un lapso de una semana. Las muestras de suero no deberán congelarse y descongelarse repetidamente. Los congeladores con descongelación automática no son recomendados como unidades de almacenamiento. No se recomienda uso de sueros que muestran hemólisis, lipemia o contaminación microbiana.

El suero deberá ser analizado a una dilución de 1:10, utilizando diluyente de suero para la preparación de la misma. Los sueros que al ser analizados a esta dilución inicial resulten positivos, deberán ser titulados por medio de diluciones seriadas. Las diluciones seriadas deberán hacerse a partir de la dilución inicial de 1:10, y pueden ser preparadas utilizando ya sea Diluyente de Suero o PBS.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Prepare una dilución 1:10 de suero del paciente utilizando Diluyente de Suero.
- Remueva la lámina del paquete de papel aluminio.
- Utilizando una pipeta Pasteur, añada la cantidad suficiente de suero diluido (aproximadamente 15 μ L) para recubrir cada pozo.
- Coloque la lámina en una cámara húmeda e incube a 37 C durante 30 minutos.
- Enjuague brevemente con un chorro suave de solución de PBS (evitando dirigir el chorro de PBS directamente a los pozos) y sumerja luego en PBS durante 5 minutos.
- Deje secar la lámina al aire, colocándola parada de lado sobre una toalla absorbente.
- Con un hisopo de algodón humedecido con agua destilada seque los espacios entre los pozos de reactividad.
- Añada solamente la cantidad necesaria de conjugado para recubrir cada pozo (15 μ L).
- Incube a 37 C en cámara húmeda durante 30 minutos.

- Enjuague y seque la lámina como fue descrito en los pasos 5 y 6.
- Justo antes de leer, añada una cantidad suficiente de líquido de montaje a cada pozo, de modo que todo el substrato quede cubierto cuando el cubreobjeto sea colocada. Cubra con un cubreobjeto No. 1 de 22 x 50 mm.
NOTA: La adición de líquido de montaje en exceso puede causar un movimiento excesivo del cubreobjeto. De otro modo, la adición insuficiente del mismo puede hacer que parte del substrato sea imposible de leer.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La reacción se considera POSITIVA cuando el 15-25% de las células en cada campo visual exhiben fluorescencia (en el citoplasma o en toda la célula) de color amarillo a amarillo-verdoso. Las demás células proporcionan un fondo de contraste de color rojo. El título de anticuerpo para el AP-VEB es el recíproco de la dilución más alta de suero, el cual produce una fluorescencia de una cruz 1+. Una reacción positiva a una dilución de 1:10 indica la presencia de anticuerpos de tipo IgG contra el AP-VEB.

La reacción se considera NEGATIVA cuando las células no fluorescen de color amarillo verdoso sino que aparecen de color rojo debido al colorante de contraste o exhiben menos de 1+ de reacción en la dilución de tamizaje. Una reacción negativa a la dilución de 1:10 indica la ausencia de anticuerpos detectables de tipo IgG contra el AP-VEB.

La presencia de anticuerpos de tipo AP-VEB deberá ser evaluada en relación con los síntomas del paciente, su historia clínica, y las respuestas inmunes contra el antígeno de cápsida vírica (ACV) y el antígeno nuclear (AN) del VEB para poder establecer un diagnóstico definitivo. El Valor Límite positivo/negativo para la presencia de anticuerpos de tipo IgG contra el AP-VEB ha sido establecido en la dilución 1:10. Es un hecho reconocido que la presencia de anticuerpos en un título de 1:10 no está necesariamente relacionado con síntomas causados por infección presente por el VEB, pues algunos individuos sanos pueden presentar títulos de 10.

Algunos sueros producen reacciones que no puede determinarse si son positivas o negativas debido a los niveles tan altos de fluorescencia no-específica (FNS) que estos presentan. Estos sueros por lo general hacen que más de un 50% de las células fluoreszcan a una dilución de 1:10, oscureciendo de este modo las reacciones verdaderas a la prueba. La dilución adicional de estos sueros es posible que alivie el problema de FNS y permita leer una reacción **positiva**, pero de otro modo, una reacción negativa a estas diluciones no puede ser interpretada como una reacción negativa verdadera para la presencia de anticuerpos de tipo IgG contra el AP-VEB, ya que la dilución 1:10 no pudo ser leída. Un suero que produzca una reacción negativa a diluciones mayores, pero que no pueda ser leído a la dilución 1:10 debido a la presencia de FNS, deberá ser vuelto a examinar utilizando una muestra de suero nueva, o de otro modo, el resultado podrá reportarse como "indeterminado para la presencia de anticuerpos de tipo IgG contra el AP-VEB debido a la presencia de FNS".

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.

Cada kit contiene Sueros Controles Positivo y Negativo los cuales deberán ser corridos cada vez que la prueba sea realizada.

El Suero Control Negativo debe dar una reacción menor de 1+ con la solución de trabajo 1:10.

El Suero Control Positivo es titulado para proporcionar un estándar para chequear la sensibilidad de la prueba. Éste deberá exhibir una reacción positiva fuerte a la dilución inicial en que se hizo la prueba y disminuir hasta una reacción igual a una cruz: 1+, como se mencionó anteriormente. Una variabilidad día a día de un título seriado en la dilución, el cual puede ser mayor o menor que el título especificado se considera funcionamiento aceptable.

En caso de que el ensayo no sea válido puesto que los valores obtenidos en los Controles Positivos o Negativos no caigan dentro de los límites especificados y si los resultados esperados para el control no son observados, repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local. Como primer paso para determinar la causa de esta falla, repita los test de control.

Se pueden correr controles adicionales de acuerdo a los requisitos de regulaciones o organizaciones acreditadas locales, de estado, y/o federales. Se puede referir a "Clinical Laboratory Medicine – In Vitro Diagnostic Medical Devices – Validation of User Quality Control Procedures by the Manufacturer (ISO/FDIS 15198)" para más información a cerca de prácticas de control de calidad.

VALORES ESPERADOS

En infecciones primarias agudas causadas por el VEB la respuesta inmunológica de la producción de IgG contra el AP sigue un curso muy similar a la del ACV pero es más transiente; disminuyendo a niveles bajos pero detectables meses, o en algunos casos, años después de un episodio de mononucleosis infecciosa (MI). Los títulos de anticuerpos contra el AP tienden a ser más bajos que los que se producen contra el ACV, y por lo general no exceden un valor de 640 en esta prueba. La presencia de anticuerpos contra el AP acompañada de anticuerpo de tipo IgM contra el ACV es indicativa de infección primaria, pero debe tenerse en cuenta que en aproximadamente 10-20% de adultos y niños con MI aguda, no aparecen anticuerpos contra el AP.¹³

Los anticuerpos contra el AP por lo general se encuentran ausentes o tienen títulos muy bajos en individuos con infecciones latentes. Los pacientes inmunosuprimidos e inmunodeficientes y algunas personas en edad avanzada por lo general poseen títulos altos de anticuerpos de tipo IgG contra el AP y el ACV, lo cual se atribuye por lo general a reactivación del virus latente.¹⁶

Los títulos elevados de IgG contra el AP y el ACV acompañados de niveles estables de anticuerpo contra el AN son evidencia serológica de la reactivación del VEB. Los incrementos cuádruples o mayores en los títulos de IgG contra el AP y el ACV pueden ocurrir como una reactivación no específica del virus latente en algunos pacientes con trasplantes renales y con SIDA, inmunosuprimidos o inmunodeficientes.¹³

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los resultados de la prueba no deberán ser usados en presencia de reactivos no específicos en la muestra examinada, los cuales se adhieren al substrato celular. Las uniones no-específicas son fácilmente discernibles puesto que la tinción producida por este tipo de reacción involucra la mayoría de las células, mientras que la tinción específica del AP-VEB solamente del 15-25% de las mismas (aquellas que expresan antígenos precoces al VEB). Debe tenerse cuidado al interpretar reacciones en las cuales más del 30% de las células presenten fluorescencia. En estas condiciones, el resultado positivo deberá mostrar la presencia característica de una fluorescencia celular completa en el control positivo, en vez de la fluorescencia no-específica la cual se restringe al núcleo o a la membrana celular.
- Los resultados de la prueba en sueros con títulos altos de anticuerpo contra el antígeno nuclear del VEB pueden ser difíciles de interpretar. Estos sueros por lo general muestran una fluorescencia amarilla opaca en el núcleo de más de 50% de las células la cual no es típica de la fluorescencia citoplásmica o de toda la célula de color amarilla-verdosa que es característica del AP. Como se indicó anteriormente, la observación detallada del patrón de tinción de fluorescencia característica del Control Positivo del AP-VEB ayudará a interpretar la prueba para anticuerpos de tipo IgG para el AP-VEB (MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA).
- Incrementos cuádruples o mayores en los títulos de IgG contra el AP y el ACV son posibles en casos de reactivación no-específica de un virus latente en algunos pacientes con SIDA y en otros pacientes inmunosuprimidos e inmunodeficientes.¹³ Niveles elevados de anticuerpos de tipo IgG contra el AP-VEB son vistos con frecuencia en pacientes con linfoma de Burkitt, carcinomas nasofaríngeos u otro tipo de enfermedades malignas.¹⁶
- Los títulos finales en la prueba de MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA para detectar anticuerpos de tipo IgG contra el AP-VEB pueden variar dependiendo del microscopio, de la luz, del sistema de filtros y del tiempo de uso del bombillo utilizado en la lectura de las reacciones.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La prueba de IFI para detectar anticuerpos de tipo IgG contra el AP-VEB (MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA) es un método sensible y rápido para la determinación cualitativa y cuantitativa de anticuerpos de tipo IgG contra los componentes D y R del AP-VEB en suero humano. La sensibilidad de cada lote del kit es controlada probando sueros de referencia para asegurar que los resultados entre lote y lote sean reproducibles. La reproducibilidad de la prueba de MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA para detectar anticuerpos de tipo IgG contra el AP-VEB fue evaluada y se encontró que esta se encontraba dentro de un rango aceptable de más o menos una dilución seriada. Los resultados obtenidos en estudios clínicos y al examinar sueros de referencia indican que la prueba de MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA para detectar anticuerpos de tipo IgG contra el AP-VEB es específica para anticuerpos contra el AP-VEB y que no presenta reactividad cruzada con anticuerpos de tipo IgG contra otros virus de la familia del herpes. Sueros de referencia con títulos de IgG contra el AP-VEB tan altos como 640 han sido examinados, y éstos, al ser probados, no han mostrado evidencia de fenómeno de prozona.

DEUTSCH

MERIFLUOR®

EBV-EA IgG IFA

Immunfluoreszenz-Methode zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das EA des EBV in Humanserum

REF EA101

IVD In-vitro-Diagnostikum

R. Only

VERWENDUNGSZWECK

Der MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test ist eine sensitive und schnelle indirekte Immunfluoreszenz-Methode für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Antikörpern gegen das „Early“-Antigen (EA) des Epstein-Barr-Virus (EBV) in Humanserum. Bei vorschriftsmäßiger Durchführung weist der MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test IgG-Antikörper gegen die Komponenten „Diffuse“ (D) und „Restricted“ (R) des EBV-EA-Komplexes nach und ist hervorragend geeignet, um unterstützende Informationen für die Diagnose einer EBV-assoziierten Erkrankung zu erhalten.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Das Epstein-Barr Virus ist ein weit verbreitetes menschliches Pathogen, das im allgemeinen Infektionen in früher Kindheit verursacht, die entweder asymptomatisch oder als milde Erkrankung verlaufen. Personen, die eine EBV-Infektion erst im jungen Erwachsenenalter durchlaufen, entwickeln oft eine klassische infektiöse Mononukleose (IM). Bei ungefähr der Hälfte der Patienten mit einer IM entwickelt sich eine Splenomegalie, bei einem geringeren Prozentsatz eine Hepatomegalie oder beides.¹ Eine EBV-Mononukleose ist eher durch eine abnormale Leberfunktion gekennzeichnet als eine Cytomegalovirus (CMV)-assoziierte Mononukleose. Beide Erkrankungen müssen bei der Differentialdiagnose einer Hepatitis berücksichtigt werden.²

Komplikationen einer EBV-Infektion können das Nerven- und Herzsystem, Augen, Atmung, Blut, Verdauungstrakt und Nieren betreffen.³ Mit neurologischen Symptomen assoziierte EBV-Infektionen sind: Bell's Palsy, Guillain-Barré Syndrom, Meningo-Enzephalitis, Reye's Syndrom, Myelitis, Neuritis der kranialen Nerven und psychosomatische Störungen.^{4,5} Eine bulbäre Beteiligung mit daraus resultierender respiratorischer Lähmung kann tödlich verlaufen.⁵ Burkitt Lymphome, Nasopharynxkarzinome und Neoplasien des Thymus, Glandula parotis und supraglottischer Kehlkopf werden ebenfalls mit einer EBV-Infektion assoziiert.^{5,7,8,9}

Ähnlich anderer Herpesvirus-Infektionen handelt es sich bei EBV um eine latente Infektion.¹⁰ Das Genom persistiert in den B-Zellen des lymphoretikulären Systems und in den Epithelzellen des Oropharynx.¹¹ Bluttransfusionen von einem immunisierten Spender auf einen nichtimmunisierten Empfänger löst eine Primärinfektion aus, das IM Postperfusion Syndrom.¹² Die Reaktivierung einer latenten Infektion wird mit einer persistierenden Erkrankung in Verbindung gebracht, die als chronische Mononukleose oder chronische EBV-Infektion bezeichnet wird. Persistierende EBV-Infektionen können möglicherweise einen Kofaktor bei der Entwicklung von AIDS in asymptomatischen Personen, die mit dem HIV infiziert sind, darstellen.¹³

Auf eine EBV-Infektion folgt die Expressierung von viralen Capsid Antigenen (VCA), „Early“ Antigenen (EA) und von nukleären Antigenen (EBNA) mit entsprechenden Antikörperreaktionen. Die Synthese der „Early“ Antigene findet früh während der viralen Replikation und vor der DNA-Synthese statt.¹⁴ Während der akuten Phase sind IgM- und IgG-Antikörper gegen VCA vorhanden, IgG-Antikörper gegen EA müssen dagegen nicht anwesend sein.⁵ Treten EA-Antikörper zusammen mit EBNA-Antikörpern auf, verstärkt dies die Diagnose einer Reaktivierung einer EBV-Infektion.^{13,15} Erhöhte Werte der EA- und VCA-IgG-Antikörper liegen oft bei Patienten mit chronischer Mononukleose und bei immunsupprimierten oder älteren Patienten nach Reaktivierung der latenten EBV-Infektion vor.^{13,16} Eine anhaltende erhöhte EA-Antikörperantwort bei gleichzeitiger Anwesenheit von EBNA-Antikörpern ist für eine Reaktivierung oder eine persistierende akute EBV-Infektion charakteristisch.¹³

Der indirekte Immunfluoreszenz-Antikörper-(IFA) Test wird für die serologische Bestimmung des Antikörperstatus gegen EBV-EA eingesetzt. Der MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test weist Antikörper gegen die „Diffuse“ (D) und „Restricted“ (R) Komponenten des „Early“ Antigens nach. Dieser Test kann nicht zwischen diesen beiden Komponenten differenzieren. Die Suche nach Anwesenheit von EA-Antikörpern und anderen EBV-assoziierten EBV-Antigenen kann hilfreiche diagnostische Informationen liefern.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Im MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test wird die indirekte Immunfluoreszenz-Antikörper (IFA)-Methode angewendet. Virus-infizierte Zellen dienen als Substrat. Diese EBV-infizierten Zellen sind auf den Objektträgern fixiert und werden mit Patientenserum beschichtet. Vorhandene Antikörper binden sich an die viralen Antigene. Die Antigen-IgG-Komplexe werden durch die Zugabe von Fluoreszein markiertem Anti-Human-IgG sichtbar gemacht. Im positiven Fall zeigt sich eine spezifische zytoplasmatische, nukleäre hellgelbe bis grüne Fluoreszenz der EBV-infizierten Zellen.

REAGENZIENTHALTENE MATERIALIEN

Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Außenseite der Packung angegeben.

- EBV-EA antigenbeschichtete Objektträger:** Mit darauf fixierten Raji-Zellen eines Burkitt Lymphoms. Ca. 15-25% der Zellen exprimieren das EBV-EA-Antigen und erlauben damit ein leichtes Ablesen der Ergebnisse und einen optimalen Kontrast. Positive Zellen wurden chemisch induziert, um die EBV-EA-Expression zu gewährleisten und die Produktion von infektiösen EBV-Virionen durch Inhibitoren der DNA-Synthese zu verhindern. Die negativen Zellen sind Raji-Zellen, die nicht chemisch induziert wurden. Nach Entfernen der Verpackung sind die Objektträger gebrauchsfertig. Ungeöffnete Objektträger sind bei Lagerung von 2-8 C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Verwenden Sie keine Objektträger, wenn die Anzeige des Trockenmittels (die Linie in der Mitte des Trockenmittels) die Farbe von Blau zu Rosa geändert hat.
- PBS-Pulver:** Inhalt in 1 L Aqua dest. auflösen. Gebrauchsfertiger Puffer ist 0,01 M, hat den pH-Wert 7,5 und enthält Natriumazid. Die Lösung wird bei 2-8 C gelagert und ist unbegrenzt haltbar.
- Probenpuffer:** In 20 mL PBS auflösen (dauert ca. 10 min). Vor jedem Gebrauch gründlich mischen. Der rekonstituierte Probenpuffer enthält Proteine (Ziege) und Stabilisatoren. Die Lösung ist 6 Monate bei 2-8 C haltbar.
- Positives und negatives Kontrollserum (Wenden Sie sich an Punkt 4 unter dem Abschnitt Vorsicht):** Lyophilisiert, jeweils mit 1 mL PBS verdünnen – ergibt eine 1:10 Verdünnung. Der Titer der Positivkontrolle ist auf dem Etikett aufgedruckt. Die verdünnten Seren sind 6 Wochen bei 2-8 C oder 8 Monate bei ≤ -20 C haltbar.
- Konjugat:** Lyophilisiert, Fluoreszein-markiertes Anti-Human-IgG (Ziege), in 3 mL PBS auflösen. Enthält < 0,1% Evans Blau zur Gegenfärbung. Rekonstituiertes Konjugat ist 2 Wochen bei 2-8 C oder aliquotiert und bei ≤ -20 C gelagert 8 Monate haltbar. Aufgetaute Aliquots sollten nicht mehr eingefroren werden.
- Eindeckmittel:** Das Eindeckmittel besteht aus einem 0,2 M Phosphat-gepufferten Glycerin-Wasser-Gemisch (pH 8,0). Das Gemisch ist so eingestellt, daß die Elution der Gegenfärbung minimiert ist. Das Eindeckmittel ist gebrauchsfertig und kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

- Reagenzgläser (12 x 75 mm), Halterung, und Pipetten zur Serumverdünnung
- Messzylinder
- Waschflasche
- Destilliertes Wasser
- Färbeküvette
- Wattestäbchen, saugfähige Tücher
- Feuchte Kammer
- Deckgläser, Nr. 1, 22 x 50 mm
- Inkubator, 37 C
- Ein Fluoreszenzmikroskop, FITC Blaulichtfiltersystem, Sperrfilter (515 nm) oder ein vergleichbares Filtersystem zur Bestimmung des Fluoreszeins wird ebenso für die Durchlichtmikroskopie mit Dunkelfeldkondensator als auch für die Auflichtmikroskopie bei Verwendung eines dichromatischen Spiegels (500 nm) empfohlen.

VORSICHTSMASSNAHMEN

Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die in-vitro-Diagnostik bestimmt.

WARNUNG

- Das Konjugat enthält Evans Blau als Farbstoff zur Gegenfärbung. Der Farbstoff kann krebserregend sein. Hautkontakt vermeiden!
- Das PBS-Pulver enthält Natriumazid, und kann mit Blei- oder Kupferrohren reagieren und zu potentiell explosiven Metallazid-Verbindungen führen. Für die Beseitigung der natriumazidhaltigen Reagenzien sollten größere Mengen Wasser benutzt werden, um eine Metallazidbildung zu verhindern.
- Natriumazid ist bei Verschlucken hoch giftig, bei Kontakt mit Säure entwickelt sich ein hochgiftiges Gas. Bei Kontakt mit der Haut muß es sofort mit viel Wasser abgewaschen werden.
- Proben, Kontrollen und mit diesen Substanzen in Kontakt kommende Materialien als potenziell biogefährliche Substanzen handhaben. Die Basismaterialien, die dazu benutzt werden, die Kontrollreagenzien herzustellen, wurden am Spender getestet und erwiesen sich als nicht reaktiv auf Antigene oder Antikörper gegen die folgenden Viren: Humane Immundefizienz-Viren (HIV-1, HIV-2), Hepatitis-B-Virus, Hepatitis-C-Virus, so wie von den FDA-lizenzierten Tests definiert. Da jedoch keine Testmethode das Vorliegen von Krankheitserregern vollständig ausschließen kann, sind diese Materialien mit den Praktiken der Biosicherheitsstufe 2 (Biosafety Level 2) zu handhaben, wie in der Veröffentlichung „Biosafety and Microbiology and Biomedical Laboratories“, der US-amerikanischen Gesundheitsbehörden CDC/NIH empfohlen.

GEFAHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

Für weitere Informationen zu den Gefahren- und Sicherheitshinweisen, beziehen Sie sich auf die SDS, die unter folgendem Link verfügbar sind: www.meridianbioscience.com (US Version) / www.meridianbioscience.eu (EU Version).

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

- Der gesamte Kit wird im Kühlschrank (2-8 C) gelagert.
- Nach Rekonstitution der Reagenzien ist der Kit gebrauchsfertig.
- Rekonstituiertes Konjugat und rekonstituierte Seren bei ≤ -20 C lagern. Gefrierschränke mit Abtauautomatik sind zur Lagerung ungeeignet.
- Reagenzien sollten nach dem Auftauen nicht wieder eingefroren werden.
- Einzelne Objektträger erst kurz vor Gebrauch aus der Verpackung nehmen.
- Reagenzien und Objektträger dürfen nach dem aufgedruckten Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden.
- Sollten lyophilisierte Reagenzien Anzeichen einer Rehydratisierung aufweisen, sollten sie nicht eingesetzt werden.
- Andere Inkubationszeiten und -temperaturen als angegeben, können zu falschen Ergebnissen führen.
- Die Komponenten dieses Kits wurden als Einheit geprüft und standardisiert. Die Verwendung von Bestandteilen anderer Chargen oder Herstellern kann zu unbefriedigenden Resultaten führen.

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

Blut durch Venenpunktion entnehmen, bei Raumtemperatur vollständig gerinnen lassen und dann 10 min bei 1500 x g und Raumtemperatur zentrifugieren. Das Serum sollte so schnell wie möglich abgetrennt und gekühlt werden (2-8 C) oder, falls es innerhalb einer Woche nicht getestet wird, bei ≤ -20 C eingefroren werden. Serumproben sollten nicht wiederholt aufgetaut und eingefroren werden. Gefrierschränke mit Abtauautomatik sind zur Lagerung ungeeignet. Hämolytische, lipämische oder mit Mikroorganismen kontaminierte Seren sollten nicht verwendet werden.

Die Seren sollten mit einer 1:10 Verdünnung untersucht werden. Die Screening-Verdünnungen müssen mit dem Probenpuffer angesetzt werden. Seren, die mit der Screening-Verdünnung positiv reagieren, können in zweifachen Verdünnungsstufen titriert werden. Die Titrationsverdünnungen sollten von der 1:10 Screening-Verdünnung begonnen und entweder mit dem Probenpuffer oder mit PBS angesetzt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

- Eine 1:10 Verdünnung der Patientenserum mit dem Probenpuffer ansetzen.
- Objektträger aus der Folie herausnehmen.
- Mit Hilfe einer Pasteurpipette verdünnte Seren (ca. 15 μ L) auf die Antigenfelder auftragen.
- Objektträger in die feuchte Kammer legen, 30 min bei 37 C inkubieren.
- Objektträger kurz mit PBS abspülen, anschließend Objektträger 5 min in PBS stellen.
- Objektträger auf ein absorbierendes Tuch stellen und lufttrocknen lassen.
- Raum zwischen den Auftragsstellen mit einem mit destilliertem Wasser getränkten Wattestäbchen trocknen.
- Ca. 15 μ L Konjugat auf die Antigenfelder auftragen.
- Objektträger in der feuchten Kammer 30 min bei 37 C inkubieren.
- Objektträger kurz mit PBS abspülen und wie unter Punkt 5 und 6 beschrieben trocknen.
- Kurz vor dem Ablesen genügend Eindeckmittel auf jedes Feld geben, damit beim Auflegen des Deckgläschens das Substrat vollständig abgedeckt wird.
- Achtung:** Zugabe von überschüssigem Eindeckmittel kann ein verstärktes Bewegen des Deckgläschens verursachen. Zu wenig Eindeckmittel kann zur Unlesbarkeit von Teilen des Substrats führen.
- Ergebnisse innerhalb von 24 Stunden bei einer 150-200 fachen Vergrößerung auswerten. Objektträger sollten im Dunkeln gelagert werden, sofern sie nicht sofort ausgewertet werden.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Das Ergebnis ist positiv, wenn die infizierten Zellen in jedem Feld (ca. 15-25% der Zellen) eine deutliche grüneliche, zytoplasmatische oder über die gesamte Zelle ausgedehnte Fluoreszenz zeigen. Die restlichen Zellen erscheinen als roter Hintergrund. Der EBV-EA-Titer ergibt sich aus der höchsten Serumverdünnung, die noch eine 1+ Reaktion zeigt. Eine positive Reaktion bei einer 1:10 Verdünnung oder größer deutet auf die Anwesenheit von IgG-Antikörpern gegen EBV-EA hin.

Ein negatives Ergebnis liegt vor, wenn die Zellen keine grüneliche Fluoreszenz zeigen und alle Zellen aufgrund der Gegenfärbung rot erscheinen oder weniger als eine 1+ Reaktion in der Screening-Verdünnung zeigen. Ein negatives Ergebnis mit der Screening-Verdünnung deutet auf keine nachweisbaren IgG-Antikörper gegen EBV-EA hin.

Testergebnisse für den Nachweis von EBV-EA-Antikörpern sollten zusammen mit den Symptomen, der Klinik und den Antikörperantworten gegen VCA und EBNA evaluiert werden, um eine Diagnose zu erstellen. Der cut-off Wert wurde bei einer 1:10 Verdünnung als Indikator für die Anwesenheit von IgG-Antikörpern gegen EBV-EA gesetzt. Es ist zu beachten, daß Antikörper titer von 1:10 nicht notwendigerweise mit den akuten Symptomen einer EBV-Infektion in Verbindung stehen. „Normale“ gesunde Personen können ebenfalls Titer von 1:10 aufweisen.

Einige Seren können aufgrund ihrer hohen nicht-spezifischen Fluoreszenz (NSF) weder positiv noch negativ eingestuft werden. Beim Einsatz dieser Seren zeigt sich bei einer 1:10 Verdünnung eine Fluoreszenz von ca. 50% der Zellen, die das wirkliche Ergebnis überdeckt. Weitere Verdünnungen können dieses NSF-Problem mildern und das Ablesen einer positiven Reaktion erlauben; dem-gegenüber können, wenn die 1:10 Verdünnung nicht ablesbar ist, negative Reaktionen nicht als wirklich negativ für den Nachweis von IgG-Antikörpern gegen EBV-EA eingestuft werden. Ein Serum, das bei höheren Verdünnungen negativ reagiert, aber bei der 1:10 Verdünnung aufgrund der NSF nicht ablesbar ist, muß erneut mit einer frisch entnommenen Probe getestet oder als „nicht ablesbar für EBV-EA IgG aufgrund des NSF“ deklariert werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zustellungsbehördlichen Auflagen durchführen.

Jeder Kit enthält Positiv- und Negativkontrollen, die bei jedem Testdurchlauf mitgeführt werden sollten.

Die Negativkontrolle darf bei der Screening-Verdünnung von 1:10 allerhöchstens eine sehr schwache Reaktion (< 1+) zeigen.

Die Positivkontrolle austrieren, um einen Standard für die Testsensitivität zu erhalten. Die Positivkontrolle sollte mit der Screening-Verdünnung stark positiv reagieren und bei dem auf dem Etikett aufgedruckten Titer auf eine 1+ Reaktion abfallen. Abweichungen um eine Titerstufe in beide Richtungen liegen innerhalb der Toleranzgrenze. Zeigen die Kontrollen nicht die erwarteten Resultate, ist der Testdurchlauf unzulässig.

Liegen die Werte für die Positiv- und Negativkontrolle nicht innerhalb des spezifizierten Bereichs, ist der Test nicht auswertbar. Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, zur Ermittlung der Ursache des Versagens, als Erstes die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Distributor.

Zusätzliche Kontrollen können gemäß der Richtlinien bzw. der jeweils geltenden Anforderungen der zuständigen Behörden oder Akkreditierungsorganisationen getestet werden. Siehe hierzu auch "Clinical Laboratory Medicine – In Vitro Diagnostic Medical Devices – Validation of User Quality Control Procedures by the Manufacturer (ISO/FDIS 15198)" bezüglich weiterer Informationen für Qualitätskontrollen.

ERWARTUNGSWERTE

Bei einer akuten primären Infektion mit EBV folgt die IgG-Antwort auf EA dicht auf die VCA Antwort. Aber sie ist von kürzerer Dauer, fällt auf niedrigere, jedoch noch nachweisbare Titer Monate oder, in einigen Fällen, Jahre nach einer IM ab. EA-Antikörper neigen dazu, niedriger als VCA-Antikörper titer zu liegen und überschreiten in diesem Test normalerweise keinen Titer von 1:640. EA-Antikörper treten zusammen mit VCA-IgM-Antikörpern auf und beweisen damit eine Primärinfektion, jedoch ist zu beachten, daß in ca. 10-20% der Erwachsenen und Kinder mit einer akuten IM keine EA-Antikörper nachgewiesen werden können.¹³

EA-Antikörper sind entweder nicht oder mit niedrigeren Titern bei Personen mit latenter Infektion vorhanden. Hohe EA- und VCA-IgG-Antikörpertiter, die höchstwahrscheinlich auf eine Reaktivierung eines latenten Virus zurückzuführen sind, liegen oft bei immunsupprimierten oder immundefizienten Patienten und einigen Personen höheren Alters vor.¹⁶

Erhöhte EA- und VCA-IgG-Titer mit gleichzeitigem Nachweis stabiler EBNA-Antikörpertiter sprechen für eine EBV-Reaktivierung. Vierfache oder höhere Titeranstiege der EA- und VCA-IgG-Antikörper können bei einigen Nierentransplantatempfängern, AIDS-Patienten, immunsupprimierten oder immundefizienten Patienten als nichtspezifische Reaktivierung des latenten Virus nachgewiesen werden.¹³

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Testresultate sollten nicht verwendet werden, wenn nichtspezifische Reaktionspartner der Probe sich an das Substrat binden. Nichtspezifische Bindungen können leicht unterschieden werden, da diese Fluoreszenz die Mehrzahl der Zellen – während die spezifische Färbung nur ca. 15-25% der Zellen (nur die das „Early“ Antigen für EBV exprimieren) – betrifft. Vorsicht bei der Interpretation der Ergebnisse ist geboten, wenn mehr als 30% der Zellen fluoreszieren. In diesen Fällen müssen bei den positiven Resultaten die gesamten Zellen fluoreszieren (wie es bei der positiven Kontrolle zu sehen ist), und sich von der nichtspezifischen Fluoreszenz, die nur auf den Kern oder die Zellmembran begrenzt ist, unterscheiden.
2. Testergebnisse mit hohen Antikörpertitern gegen das nukleäre Antigen können gegebenenfalls schwierig zu interpretieren sein. Diese Seren zeigen typischerweise bei ca. 50% der Zellen eine matte gelbe, nukleäre Fluoreszenz, die nicht typisch für die grün-gelbliche zytoplasmatische bzw. die gesamte Zelle betreffende Fluoreszenz – charakteristisch für EA – ist. Wie oben beschrieben, ist eine genaue Auswertung der charakteristischen Fluoreszenzmuster der positiven EBV-EA Kontrolle hilfreich bei der Interpretation der MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test Ergebnisse.
3. Ein vierfacher oder höherer Titeranstieg der EA-IgG- oder VCA-IgG-Antikörper kann durch eine nichtspezifische Reaktivierung des latenten Virus bei einigen AIDS Patienten und anderen immunsupprimierten oder immundefizienten Patienten auftreten.¹³ Erhöhte EBV-EA IgG-Titer werden oft bei Patienten mit Burkitt Lymphomen, Nasopharynxkarzinomen und anderen Erkrankungen gefunden.¹⁶
4. Endpunkttiter können aufgrund des verwendeten Mikroskoptyps, der Lichtquelle, Alter der Lichtquelle und des eingesetzten Filtersystems variieren.

LEISTUNGSMERKMALE

Bei vorschriftsmäßiger Durchführung stellt der MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test ein sensitives und schnelles Verfahren für den qualitativen und quantitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen die D- und R-Komponente des EBV-EA im Humanserum dar. Die Sensitivität jeder Charge wird mit Referenzseren getestet, um reproduzierbare Ergebnisse von Charge zu Charge zu gewährleisten. Die Reproduzierbarkeit des MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Tests wurde evaluiert und liegt im Bereich einer Titerstufe innerhalb der Toleranzgrenze. Testergebnisse klinischer Studien und der Referenzseren zeigen, daß der MERIFLUOR EBV-EA IgG IFA Test spezifisch für den Nachweis von EBV-EA Antikörpern ist und nicht mit den IgG-Antikörpern anderer Herpesviren kreuzreagiert. Bei Referenzseren mit EBV-EA spezifischen IgG-Titern von 1:640 wurde kein Prozen-Phänomen nachgewiesen.

REFERENCES

1. Evans, A.S. and Niederman, J.C. Epstein-Barr Virus. *In Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*, 2nd ed. Evans, ed. Plenum Medical. New York, 1982.
2. Horwitz, C.A., et al. Heterophil-Negative Infectious Mononucleosis and Mononucleosis-Like Illnesses. *Am. J. Med.* 1977; 63:947-57.
3. Sumaya, C.V. and Ench, Y. Epstein-Barr Virus Infectious Mononucleosis in Children. I. Clinical and General Laboratory Findings. *Pediatrics* 1985;75:1003-10.
4. Fleisher, G., et al. Primary Epstein-Barr Virus Infection in Association with Reye Syndrome. *J. Pediatr.* 1980;97:935-37.
5. Gottlieb-Stematsky, T. and Glaser, R. Association of Epstein-Barr Virus with Neurologic Diseases. *In Human Herpesvirus Infections: Clinical Aspects*. Glaser and Gottlieb-Stematsky, eds. Marcel Dekker. New York, 1982.
6. Henle W. and Henle G. Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis. *In Human Herpesvirus Infections: Clinical Aspects*. Glaser and Gottlieb-Stematsky, eds. Marcel Dekker. New York, 1982.
7. Leyvraz, S., et al. Association of Epstein-Barr Virus with Thyroid Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1985;312:1296-99.
8. Saemundsen, A.K. et al. Epstein-Barr Virus in Nasopharyngeal and Salivary Gland Carcinomas of Greenland Eskimos. *Br. J. Cancer.* 1982;46:721-28.
9. Brichacek, B., et al. Association of Some Supraglottic Laryngeal Carcinomas with EB Virus. *Int. J. Cancer.* 1983;32:193-97.
10. Henle, W. and Henle, G. Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis. *N. Engl. J. Med.* 1973;288:263-64.
11. Sixbey, J.W., et al. Epstein-Barr Virus Replication in Oropharyngeal Epithelial Cells. *N. Engl. J. Med.* 1984;310:1225-30.
12. Henle, W., et al. Antibodies to Early Antigens Induced by Epstein-Barr Virus in Infectious Mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 1971;124:58-67.
13. Sumaya, C.V. Infectious Mononucleosis and Other EBV Infections: Diagnostic Factors. *Laboratory Management*. 1986;24:37-46.
14. Ooka, T. The Molecular Biology of Epstein-Barr Virus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1985;39:59-66.
15. Sumaya, C.V. Epstein-Barr Virus Serologic Testing: Diagnostic Indications and Interpretations. *Pediatr. Infect. Dis.* 1986;5:337-42.
16. Sumaya, C.V. Serological Testing for Epstein-Barr Virus: Developments in Interpretation. *J. Infect. Dis.* 1985;151:984-87.

Manufactured By

Meridian Bioscience, Inc.
USA/Corporate Office
 3471 River Hills Drive
 Cincinnati, Ohio 45244
 Telephone: 513.271.3700
 Orders/Customer Service:
 800.543.1980
Technical Support Center:
 800.343.3858
Information Fax: 513.272.5432
Ordering Fax: 513.271.0124

Meridian Bioscience Europe S. r. L.
Via dell'Industria, 7
 20020 Villa Cortese, Milano
 ITALY
Tel: +39 0331 43 36 36
Fax: +39 0331 43 36 16
Email: info@meridianbioscience.eu
WEB: www.meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe s.a./n.v.
 2 Avenue du Japon - 1420 Braine l'Alleud
 BELGIUM
Tel: +32 (0) 67 89 59 59
Fax: +32 (0) 67 89 59 58
Email: info.bn@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe France
 34 rue de Ponthieu - 75008 Paris
 FRANCE
Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40
Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10
Email: info.fr@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe b.v.
 Postbus 301 - 5460 AH Veghel
 NETHERLANDS
Tel: +31 (0) 411 62 11 66
Fax: +31 (0) 411 62 48 41
Email: info.bn@meridianbioscience.eu

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simbolos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusqu'à / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic 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 Diagnostika 98/79/EG.	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo para la preparación del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenzubereitung, in dem sich Probenextraktionspuffer befindet
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Numero de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabbriante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Contents sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Conjugato enzimatico / Conjugat enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Miso En Garde / Advertencia / Warnhinweise
CONJ	Conjugate / Conjugato / Conjugat / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillon / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
SUBS	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
R. Only	Caution: US Federal law restricts this device to sale by or on the order of a licensed healthcare practitioner. / La legge Federale negli Stati Uniti prevede che questo test sia venduto solo a un operatore abilitato ad operare nella salute. / Attention: La vente ou la prescription de ce dispositif par un médecin agréé est soumise à des restrictions par la loi fédérale des US. / Cuidado: Leyes federales de los EU limitan la venta de dispositivos por o por la orden de licenciados en la práctica del curso de la salud. / Verzicht: Der Verkauf oder die Verschreibung dieses Geräts durch einen zugelassenen Arzt unterliegt den Beschränkungen des US Bundesgesetzes.	DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Détection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz

For technical assistance, call Technical Support Services at (800) 343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at (800) 543-1980.



SN11746

REV. 02/16