

MERIFLUOR[®]

EBV VCA IgG IFA

An immunofluorescence test for the detection of EBV VCA IgG Antibodies to Epstein-Barr Virus

REF

EB100

IVD

In vitro diagnostic medical device

R. Only

INTENDED USE

An immunofluorescence test for the detection of EBV VCA IgG Antibodies to Epstein-Barr Virus.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Epstein-Barr virus (EBV) is recognized as the cause of infectious mononucleosis (IM). Infection with EBV is common in early childhood. Most of these childhood infections result in asymptomatic or mild disease with the development of EBV antibodies and permanent immunity. Unprotected persons who become infected in early adult life, especially those in high socioeconomic groups, generally develop full-blown, symptomatic IM.¹ IM is one of the most important disabling diseases of young adults.²

Infections produced by EBV appear to be restricted to lymphoid cells.³ Like other herpes viruses, EBV establishes a persistent carrier state.⁴ The EBV genome is carried in the peripheral leukocytes indefinitely. Blood transfusion from an immune donor to a nonimmune recipient produces a primary infection referred to as IM post-perfusion syndrome.⁵ Antibodies to viral capsid antigens (VCA) are the predominant and earliest appearing antibodies in EBV infection.³ They develop in all patients with EBV IM, Burkitt's lymphoma, and nasopharyngeal carcinoma.⁶ Elevated antibody titers to EBV-VCA are also found in some patients with Hodgkin's disease, chronic lymphocytic leukemia, systemic lupus erythematosus, sarcoidosis, and Iizumi fever.^{6,7}

While EBV is the etiologic agent of IM, cytomegalovirus and *Toxoplasma gondii* also produce IM-like disease which is often clinically indistinguishable from EBV IM. The differential diagnosis of EBV infection is especially important in those patients who are heterophil negative or have atypical clinical and hematological features or prolonged or recurrent illness.⁸

The indirect fluorescent antibody (IFA) technique is a valuable serological procedure for the determination of immune status as well as active disease. EBV-VCA seroconversion, the presence of EBV capsid IgM, or a significant rise in EBV capsid antibodies are considered evidence of active EBV infection.⁹

BIOLOGICAL PRINCIPLES

The indirect fluorescent antibody (IFA) method is used in the MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test. Lymphocytes from a Burkitt's patient are used as the VCA substrate. Patient serum is reacted with the substrate and if antibodies to EBV are present they will bind to the antigen substrate and not rise off. Subsequently, when fluoresceinated antihuman IgG is added to the reaction site, it will bind to the IgG antibodies, causing the EBV-infected cells 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 Antigen Substrate Slides:** With HR1 Burkitt's lymphocytic cells fixed onto each well. Approximately 10-20% of the cells express the viral antigen to permit easy reading and optimal contrast. The cells are rendered noninfectious by the PsoralSafe™ process. 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. The rehydrated solution 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.
- 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 counterstain and is preterified 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 buffered to pH 8.0, is a glycerol-water combination formulated 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 pipets
- Liter volumetric flask
- Wash bottle
- Distilled water
- Staining dish
- Cotton-tipped swabs, absorbent towels
- Moist chamber
- Cover slips, No. 1, 22 x 50 mm
- 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 sera are to be stored at ≤ -20 C, self-defrosting freezers are not recommended.
- Individual slide packets should remain sealed until just before use.
- Reagents and antigen slides should not be used beyond stated expiration dates.
- 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 by venipuncture should be allowed to clot at room temperature and then be centrifuged. The serum should be separated as soon as possible and refrigerated (2-8 C), or be stored frozen (≤ -20 C) if not tested within one week. Self-defrosting freezers are not recommended as storage units. The use of sera exhibiting hemolysis, lipemia or microbial growth is not recommended.

If the MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test is used to diagnose active disease, paired sera should be collected and then tested together. The first serum should be obtained as close as possible to the onset of illness and a convalescent serum obtained about 10 days later.

Sera should be screened at a 1:10 dilution. All serum dilutions should be prepared in PBS. Sera which are positive at the screening dilution can be titrated using serial two-fold dilutions.

TEST PROCEDURE

- Prepare a 1:10 dilution of the patient serum with PBS.**
- Remove slide from foil packet.
- Using a Pasteur pipet, 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 room temperature 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 room temperature 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 as soon as possible at 150X to 200X magnification.

INTERPRETATION OF RESULTS

The reaction is POSITIVE when 10-20% of the cells in each field exhibit a greenish-yellow fluorescence. The remaining cells provide a contrasting red background. The EBV IgG titer is the reciprocal of the highest dilution of serum which produces a 1+ fluorescence. A positive reaction at a dilution of 1:10 of greater indicates prior exposure to EBV.

The reaction is NEGATIVE when cells do not fluoresce 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 screening dilution indicates no detectable IgG antibody to EBV.

QUALITY CONTROL

This test should be performed by 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 titered 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 classical infectious mononucleosis, IgG antibodies to EBV develop early, reach peak titers within a few weeks, and then slowly decline to lower levels which persist indefinitely.¹¹ Measuring a four-fold or greater rise in titer is diagnostic of active disease. However, a significant titer rise is observed in less than 20% of patients, since peak titers are often reached before the acute phase specimen is drawn.³

Females and tonsillectomized children develop higher titers to EBV than their respective male and nontonsillectomized counterparts. Higher titer levels are also developed by persons with histories of pneumonia or urinary tract infections.¹² A later rise in titer, which can exceed 2560, is the result of secondary disease, such as Burkitt's lymphoma or nasopharyngeal carcinoma.^{13,14} The titer of antibodies to EBV, as with heterophil antibodies, does not reflect the severity of clinical symptoms in IM.¹¹

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- Antinuclear antibodies present in serum may interfere with the MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test. However, the diffuse, reticular or peripheral staining produced by the antinuclear antibodies is easily distinguished since it is dull and involves most of the cells.⁹ The homogeneous staining of EBV IgG antibody involves only 10-20% of the cells.
- Endpoint titers can vary depending on the type of microscope, light source, age of bulb, and filter system used to read reactions.
- A single serum titer is of limited diagnostic value in determining active disease. Persisting antibody titers can be misinterpreted in patients later infected with other agents, especially when the original EBV infection was not diagnosed.¹⁰ Also, the upper range of persisting convalescent titers overlaps with the lower range of maximal titers seen in the acute phase.⁹ Meridian's MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test is recommended when the diagnosis of active disease is to be based on a single serum specimen.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test is a sensitive and rapid method for the determination of immune status. It is also of value in diagnosing active disease by testing acute and convalescent sera to determine sero-conversion or a significant rise in antibody titer. The sensitivity of each kit lot is controlled by testing with reference sera to ensure results which are reproducible within one tube dilution. The test is specific for antibody to EBV and titers are not affected by other febrile viruses, such as coxsackievirus, adenovirus, myxovirus, and other herpes viruses.¹¹

Results of IFA tests, such as the MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test, are comparable to those of the complement fixation test¹⁵ but do not correlate with results of the heterophil antibody test. In cases of EBV IM, heterophil antibody fails to develop in about 10-15% of adults and in an even greater percentage of children. Heterophil antibody is seldom detected in infants with primary EBV IM.³ By contrast, antibody to EBV-VCA develops in all EBV infections and is not affected by age.¹³ Heterophil antibody is short-lived; whereas EBV IgG antibody persists indefinitely and can be detected by the MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test as a measure of immune status.



EBV VCA IgG IFA

Test in immunofluorescenza per la ricerca di EBV-VCA IgG anti-Virus di Epstein-Barr

REF EB100

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

R. Only

FINALITÀ D'USO

Test in immunofluorescenza per la ricerca di anticorpi IgG diretti contro EBV VCA.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è riconosciuto come l'agente eziologico della mononucleosi infettiva (MI). L'infezione da EBV è molto comune nei bambini piccoli. La maggior parte di queste infezioni pediatriche sono asintomatiche oppure causano problemi di modesta entità, con la produzione di anticorpi anti-EBV e conseguente immunità permanente. Le persone non immuni che contraggono l'infezione in età adulta, soprattutto quelle appartenenti a gruppi socio-economici elevati, molto spesso sviluppano la forma clinica e sintomatica di MI.¹ La MI è una delle più importanti malattie debilitanti nei giovani adulti.²

L' infezione da EBV sembra essere confinata alle cellule linfoidi.³ Come per gli altri componenti della famiglia Herpesviridae, anche l'infezione da EBV è caratterizzata dalla fase di latenza.⁴ Il genoma di EBV permane nei leucociti del sangue periferico indefinitamente. Le trasfusioni di sangue da un donatore immune ad un paziente non immune provocano un'infezione primaria chiamata sindrome da MI post-trasfusionale.⁵ Gli anticorpi anti-capside virale (VCA) sono quelli predominanti ed i primi a comparire nell'infezione da EBV.³ Essi sono presenti in tutti i pazienti con MI, linfoma di Burkitt e carcinoma rino-faringeo.⁶ Elevati livelli di anticorpi diretti contro EBV-VCA vengono riscontrati anche in alcuni pazienti con morbo di Hodgkin, con leucemia linfocitica cronica, lupus eritematoso sistemico, sarcoidosi e febbre Iuzumi.^{6,7}

EBV è l'agente eziologico della MI, tuttavia altri agenti infettivi, come Cytomegalovirus e *Toxoplasma gondii*, possono provocare malattie molto simili alla MI da EBV, con sintomi clinici molto spesso sovrapponibili. La diagnosi differenziale dell'infezione da EBV è molto importante soprattutto per quei pazienti che non producono anticorpi eterofili o che hanno quadri clinici o ematologici atipici, oppure stati patologici prolungati o ricorrenti.³

Il test in immunofluorescenza indiretta (IFA) rappresenta un valido mezzo per la determinazione dello stato immunitario come pure per la diagnosi della malattia acuta. Un'eventuale sieroconversione nei confronti di EBV-VCA, la presenza di IgM anti-capside di EBV oppure un aumento significativo degli anticorpi anti-capside di EBV sono considerati marker di infezione acuta da EBV.⁸

PRINCIPI BIOLOGICI

Il test MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA per le IgG anti-Virus di Epstein-Barr è basato su una tecnica di immunofluorescenza indiretta (IFA). Come substrato contenente l'antigene VCA si usano linfociti prelevati da un paziente con linfoma di Burkitt. Il siero del paziente in esame viene fatto reagire con il substrato e se nel siero sono presenti anticorpi anti-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 di EBV:** Preparati con linfociti HR1 da linfoma di Burkitt fissati su ciascun pozzetto. Circa il 10-20% delle cellule esprime l'antigene virale per permettere una facile lettura ed un'ottimale colorazione di contrasto. Le cellule sono rese non infettive mediante il procedimento PsoralSafe™. I vetrini confezionati singolarmente sono pronti all'uso una volta rimossi dalla busta in alluminio. I vetrini non utilizzati conservati a 2-8 C sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Non usare il vetrino se lo stabilizzatore di umidità (linea al centro dello stabilizzatore) è cambiato da blu a rosa.
- Tampone Fosfato (PBS) in polvere:** 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.
- Siero di 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 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 combinazione glicerolo-aqua, tamponata a pH 8,0, formulata per minimizzare l'eluzione del colorante di contrasto. È pronto all'uso.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Materiale di laboratorio per sierologia: provette 12 x 75 mm, provettiere, 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, n. 1, 22 x 50 mm.
- Microscopio a fluorescenza. Si consiglia l'uso di filtro di eccitazione FITC 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 pelle.
- La Polvere di PBS contiene sodio azide che può reagire con il piombo o con il rame delle tubature formando azzidi metalliche altamente esplosive. Quando si eliminano questi reagenti nelle condutture di scarico bisogna far scorrere molta acqua, per evitare l'accumulo di azzidi nei tubi.
- La sodio azide è molto tossica in caso di ingestione. A contatto con acidi emette gas molto tossici. In caso di contatto con la pelle, 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 e 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 dei sieri e del coniugato ricostituito si consiglia di non utilizzare congelatori dotati di scongelamento automatico.
- Le buste singole contenenti i vetrini devono rimanere sigillate fino al momento dell'uso.
- I reagenti ed i vetrini con l'antigene non devono essere usati oltre la data di scadenza.
- 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 congelatori dotati di scongelamento automatico non sono consigliati per la conservazione del siero. L'uso di sieri fortemente lipemici, emolizzati o contaminati da microorganismi non è consigliato.

Se il test MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA è usato per diagnosticare una malattia acuta, allora si devono prelevare due campioni dello stesso soggetto, che devono essere testati contemporaneamente. Il primo campione deve essere prelevato il più presto possibile dopo la comparsa dei sintomi, mentre il secondo siero deve essere raccolto circa 10 giorni dopo.

I sieri devono essere esaminati ad una diluizione screening di 1:10. Tutte le diluizioni dei campioni devono essere preparate con il tampone PBS. I sieri risultati positivi alla diluizione screening possono essere titolati usando diluizioni seriali in base 2.

PROCEDURA DEL TEST

- Preparare una diluizione 1:10 del siero del paziente usando il tampone PBS.**
- Togliere il vetrino dalla busta sigillata.
- Usando una pipetta Pasteur, distribuire una quantità di siero diluito (circa 15 µL) sufficiente a coprire la superficie del pozzetto di reazione.
- Mettere il vetrino nella camera umida ed incubare a temperatura ambiente per 30 minuti.
- Lavare brevemente il vetrino con il tampone PBS (evitare di dirigere il getto della spruzzetta direttamente contro i 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 bastoncino di cotone imbevibile con acqua distillata.
- Distribuire una quantità di Coniugato (circa 15 µL) sufficiente a coprire la superficie del pozzetto di reazione.
- Incubare il vetrino a temperatura ambiente 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 sufficiente di fluido di montaggio a ricoprire l'intera superficie di ciascun pozzetto nei risultati 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 substrato del pozzetto. Una quantità insufficiente di Fluido di montaggio può rendere illeggibile una parte del pozzetto.
- Leggere il vetrino non appena possibile, usando gli ingrandimenti 150X e 200X.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La reazione è considerata POSITIVA quando il 10-20% delle cellule in ciascun campo microscopico presentano una fluorescenza giallo-verdastra. Le altre cellule sono colorate in rosso dal colorante di contrasto. Il titolo di IgG anti-EBV 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 una pregressa esposizione a EBV.

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

CONTROLLO QUALITÀ

Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, statali, 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 reazione 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 e diminuire 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 del 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 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 +390331433636). I risultati del test non devono essere refertati fino a quando le anomalie non vengono corrette.

Ulteriori test possono essere effettuati con controlli aggiuntivi 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

Nella mononucleosi infettiva classica le IgG anti-EBV compaiono presto, raggiungono il massimo livello nel giro di poche settimane e quindi diminuiscono leggermente, rimanendo poi costanti indefinitamente.¹¹ La rilevazione di un aumento del titolo uguale o maggiore di quattro volte rispetto al precedente indica una malattia in fase acuta. Tuttavia, un aumento significativo del titolo viene osservato in meno del 20% dei pazienti, poiché il titolo massimo viene spesso raggiunto prima che il primo campione di siero venga prelevato.³

Le donne ed i bambini tonsillectomizzati producono livelli anticorpali anti-EBV più alti rispetto alla corrispondente popolazione maschile e non tonsillectomizzata. Titoli anticorpali più elevati si trovano anche in persone con anamnesi di polmonite o di infezioni urinarie.¹² Un aumento tardivo del titolo anticorpale, che può essere anche maggiore di 2560, si ha nel corso delle forme secondarie, quali il linfoma di Burkitt ed il carcinoma rino-faringeo.^{13,14} Il titolo di anticorpi anti-EBV, come per gli anticorpi eterofili, non è funzione della severità della sintomatologia.¹¹

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Gli anticorpi anti-nucleo presenti nel siero possono interferire con il test MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA. Tuttavia, la colorazione diffusa, reticolare o periferica causata dagli anticorpi anti-nucleo può essere ben differenziata poiché è opaca e coinvolge la maggior parte delle cellule.⁹ La colorazione omogenea causata dalla presenza di IgG anti-EBV coinvolge solo il 10-20% delle cellule.
- I titoli anticorpali ottenuti possono variare a seconda del tipo di microscopio, della fonte di luce, dell'età della lampadina e del sistema di filtri utilizzati per la lettura del test.
- Il titolo anticorpale di un singolo siero non è molto utile per la diagnosi di malattia acuta. Titoli anticorpali persistenti possono essere interpretati erroneamente in pazienti che successivamente contraggono infezione causata da altri agenti, soprattutto se l'infezione originaria da EBV non è stata diagnosticata.¹⁰ Inoltre, il range superiore del livello di anticorpi convalescenti persistenti spesso si sovrappone al range inferiore dei titoli massimi osservati nel corso della fase acuta.³ Si consiglia di utilizzare il test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA prodotto dalla Meridian quando la diagnosi della fase acuta della malattia deve essere basata sul risultato di un singolo siero.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Il test MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA è un metodo rapido e sensibile che consente di studiare lo stato immunologico del paziente. Esso rappresenta anche un valido aiuto per la diagnosi della malattia acuta quando si testano due sieri consecutivi dello stesso paziente, per rilevare un'eventuale sieroconversione oppure un aumento significativo del titolo anticorpale. La sensibilità di ciascun lotto di prodotto è controllata mediante sieri di riferimento per assicurare che i risultati siano riproducibili. Il test è specifico per gli anticorpi anti-EBV ed i titoli ottenuti non sono influenzati da altre infezioni virali, quali virus Cocksackie, Adenovirus, Myxovirus ed altri virus della Famiglia Herpesviridae.¹¹

I risultati dei test IFA, come quelli ottenuti con il test MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA, sono paragonabili a quelli ottenuti mediante fissazione del complemento (15) ma non sono correlabili a quelli dei test per la ricerca di anticorpi eterofili. In caso di MI da EBV, gli anticorpi eterofili non si sviluppano nel 10-15% degli adulti ed in una percentuale ancora più elevata nei bambini. Questi ultimi vengono raramente rilevati nei bambini piccoli con MI primaria da EBV.³ Per contro, gli anticorpi anti-VCA vengono riscontrati in tutte le forme di infezione da EBV e la loro produzione non è condizionata dall'età.¹³ Gli anticorpi eterofili hanno una vita breve, mentre le IgG anti-EBV persistono indefinitamente e possono essere rilevate dal test MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA come indice dello stato immunologico del paziente.

FRANÇAIS

MERIFLUOR®

EBV VCA IgG IFA

Test d'immunofluorescence pour la détection des anticorps EBV VCA IgG dirigés contre le virus d'Epstein-Barr

REF EB100

IVD

Dispositif médical de diagnostic in vitro

R. Only

BUT DE LA METHODE

Test d'immunofluorescence pour la détection des anticorps EBV VCA IgG dirigés contre le virus d'Epstein-Barr.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est reconnu comme étant l'agent responsable de la mononucléose infectieuse (MNI). L'infection à EBV est fréquente dans la petite enfance. La plupart des infections infantiles entraînent une maladie asymptomatique ou bénigne, avec développement d'anticorps anti-EBV et d'une immunité permanente. Les personnes non protégées infectées au début de l'âge adulte, et particulièrement celles issues de milieux socio-économiques aisés, développent généralement une MNI classique, symptomatique.¹ La MNI est une des plus importantes maladies invalidantes chez les jeunes adultes.²

Les infections causées par l'EBV semblent être restreintes aux cellules lymphoïdes.³ Comme d'autres virus herpétiques, l'EBV établit un état de porteur permanent.⁴ Le génome de l'EBV reste intégré indéfiniment aux leucocytes périphériques. Une transfusion sanguine d'un donneur immunisé à un receveur non immunisé entraîne une primo-infection connue sous le nom de syndrome post-transfusionnel de la MNI.⁵ Les anticorps dirigés contre les antigènes de la capsidie virale (VCA pour viral capsid antigen) prédominent et sont les premiers anticorps à apparaître lors d'une infection à EBV.³ Ils se développent chez tous les patients présentant une MNI à EBV, un lymphome de Burkitt ou un carcinome naso-pharyngien.⁶ Des titres élevés d'anticorps anti-EBV-VCA se retrouvent également chez certains patients atteints de la maladie de Hodgkin, d'une leucémie lymphocytaire chronique, d'un lupus érythémateux disséminé, d'une sarcoïdose ou d'une fièvre d'Zluzni.^{6,7}

L'EBV est l'agent étiologique de la MNI, mais le cytomégalo virus et *Toxoplasma gondii* provoquent également une maladie similaire à la MNI et qu'on ne peut souvent pas distinguer cliniquement de la MNI à EBV. Le diagnostic différentiel de l'infection à EBV est particulièrement important chez les patients qui sont négatifs pour les anticorps hétérophiles ou ceux présentant un tableau clinique et hématologique atypique ou une maladie prolongée ou récurrente.³

La technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) est une méthode sérologique utile pour la détermination du statut immunitaire et de la maladie active. Une séroconversion EBV-VCA, la présence d'IgM dirigées contre la capsidie de l'EBV ou une augmentation significative des anticorps dirigés contre la capsidie de l'EBV sont considérées comme des preuves d'une infection active par l'EBV.⁸

PRINCIPE DU TEST

Le test MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA utilise la méthode d'immunofluorescence indirecte (IFI). Des lymphocytes provenant d'un patient atteint du lymphome de Burkitt sont utilisés comme substrat VCA. On fait réagir le sérum du patient avec le substrat. Les anticorps anti-EBV 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 de la fluorescéine est ajouté au site réactionnel, il se lie aux anticorps IgG, provoquant une fluorescence des cellules infectées par l'EBV qui peut être observée au microscope à fluorescence.

MATERIEL FOURNI

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

- Lames EBV (substrat antigénique):** Portant des cellules lymphocytaires de Burkitt HR1 fixées sur chaque puits. Environ 10-20% des cellules expriment l'antigène viral, procurant une lecture aisée et un contraste optimal. Les cellules sont rendues non infectieuses par le procédé PsoralSafe™. Les lames emballées individuellement sont prêtes à l'emploi dès l'ouverture de l'emballage. Conservées à 2-8 C, les lames sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. 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.
- Sérums de contrôle positif et négatif (voir section ATTENTION point 4):** Lyophilisés. Chaque sérum de contrôle humain est reconstitué avec 1 mL de PBS pour donner une dilution de travail au 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 humaines marqués à la fluorescéine, à reconstituer avec 3 mL de PBS. Le conjugué contient du 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 8 mois aliquoté et conservé à ≤ -20 C. Eviter de recongeler des aliquots dégelés.
- Liquide de montage:** Le liquide de montage, qui est tamponné à pH 8,0 est une combinaison glycérol-eau formulée de façon à minimiser l'éluion du contre-colorant. Il est prêt à l'emploi.

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Matériel de laboratoire 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.
- Colon-tiges, papier absorbant.
- Chambre humide.
- Lamelles couvre-objet, n° 1, 22 x 50 mm.
- 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. Eviter le contact avec la peau.
- La poudre de PBS contient de l'azide de sodium pouvant réagir avec le plomb ou le cuivre des tuyaux 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 le *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))

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

- Le coffret complet doit être conservé au réfrigérateur (2-8 C).
- Le coffret est prêt à l'emploi après reconstitution des réactifs.
- Une fois reconstitués, le conjugué et les sérums doivent être conservés à ≤ -20 C. Les congélateurs auto-dégivrants ne sont pas recommandés.
- Les emballages des lames individuelles ne doivent être ouverts qu'au moment de l'utilisation.
- Les réactifs et les lames d'antigène ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption.
- 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. Le sérum doit être séparé le plus rapidement possible et être réfrigéré (2-8 C) ou être congelé (≤ -20 C) s'il n'est pas testé dans la semaine. 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.

Si le test MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA est utilisé pour diagnostiquer une maladie active, deux prélèvements de sérum doivent être recueillis et testés en parallèle. Le premier sérum doit être obtenu aussi près que possible du déclenchement de la maladie, et un sérum de convalescence doit être obtenu environ 10 jours plus tard.

Les sérums doivent être testés à une dilution de 1:10. Toutes les dilutions de sérums doivent être préparées avec du PBS. Les sérums positifs à la dilution de dépistage peuvent être titrés par dilutions successives de 2 en 2.

PROCEDURE DE TEST

- Préparer une dilution au 1:10 du sérum du patient dans du PBS.**
- Retirer la lame de son emballage.
- Ajouter, à l'aide d'une pipette Pasteur, suffisamment de sérum dilué (environ 15 μ L) pour couvrir chaque site de réaction.
- Placer la lame en chambre humide et incuber 30 minutes à température ambiante.
- 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 μ L) pour couvrir chaque site de réaction.
- Incuber la lame en chambre humide, 30 minutes à température ambiante.
- 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, n° 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 dans un puits peut empêcher la lecture d'une partie du substrat.
- Lire la lame sans délai au grossissement 150-200X.

INTERPRETATION DES RESULTATS

La réaction est POSITIVE lorsque 10-20% des cellules dans chaque champ présentent une fluorescence jauneverdâtre. Les autres cellules constituent un fond rouge contrastant. Le titre EBV IgG est l'inverse de la plus haute dilution de sérum produisant une fluorescence 1+. Une réaction positive à la dilution 1:10 ou plus indique une exposition préalable à l'EBV.

La réaction est NEGATIVE lorsque les cellules ne donnent pas de fluorescence jaune-verdâtre mais présentent une coloration rouge due au contre-colorant ou une légère coloration spécifique, inférieure à une réaction +1, à la dilution de dépistage. Une réaction négative à la dilution de dépistage indique une absence d'anticorps détectables de type IgG dirigés contre l'EBV.

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 de façon à fournir un standard permettant de vérifier la sensibilité du test. Il doit montrer 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 2 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 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. 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 la mononucléose infectieuse classique, les anticorps IgG dirigés contre l'EBV se développent rapidement et atteignent un pic en quelques semaines, puis leur taux diminue lentement vers des valeurs plus basses qui persistent indéfiniment.¹¹ L'augmentation du titre d'un facteur 4, ou plus, est un diagnostic de maladie active. Toutefois, une augmentation significative du titre n'est observée que chez moins de 20% des patients, étant donné que les titres maximaux (pics) sont souvent atteints avant le prélèvement de l'échantillon de phase aiguë.³

Les femmes et les enfants amygdalectomisés développent des titres EBV plus élevés que ceux de leurs homologues respectifs masculins ou non amygdalectomisés. Les personnes ayant des antécédents de pneumonie ou d'infections de l'appareil urinaire développent également des titres plus élevés.¹² Une augmentation ultérieure du titre, pouvant excéder 2560, résulte d'une maladie secondaire, comme par exemple le lymphome de Burkitt ou le carcinome nasopharyngien.^{13,14} Le titre des anticorps anti-EBV, comme celui des anticorps hétérophiles, ne reflète pas la gravité des symptômes cliniques de la MNI.¹¹

LIMITES DU TEST

- Des anticorps anti-nucléaires présents dans le sérum peuvent interférer avec le test MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA. Cependant, la coloration diffuse, réticulaire ou périphérique produite par les anticorps anti-nucléaires est facile à différencier, puisque faible et impliquant la plupart des cellules.⁹ La coloration homogène due aux anticorps EBV IgG implique seulement 10-20% des cellules.
- Les titres finals peuvent varier en fonction du type de microscope, de la source de lumière, de l'âge de l'ampoule ou du système de filtre utilisé pour lire les réactions.
- Le titre d'un sérum, pris individuellement, ne présente qu'une valeur diagnostique limitée pour la détermination d'une maladie active. Des titres persistants d'anticorps peuvent être mal interprétés chez des patients infectés ultérieurement par d'autres agents, surtout si l'infection à EBV originale n'a pas été diagnostiquée.¹⁰ De plus, l'intervalle supérieur des titres persistants en période de convalescence recouvre partiellement l'intervalle inférieur des titres maximaux observés dans la phase aiguë.³ Le test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA de Meridian Bioscience est recommandé dans les cas où l'on souhaite diagnostiquer une maladie active à partir d'un seul échantillon de sérum.

PERFORMANCES DU TEST

Le test MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA est une méthode sensible et rapide pour la détermination du statut immunitaire. Il permet également de diagnostiquer une maladie active en testant des sérums prélevés en phase aiguë et en phase de convalescence, pour déterminer une séroconversion ou une augmentation significative du titre d'anticorps. La sensibilité de chaque lot de coffrets est contrôlée en testant des sérums de référence de façon à assurer une reproductibilité des résultats, à un facteur de dilution 2 près. Le test est spécifique pour les anticorps anti-EBV et les titres ne sont pas affectés par d'autres virus fébriles tels que les coxsackievirus, adénovirus, myxovirus et autres hérvétovirus.¹¹

Les résultats obtenus avec les tests IFI, tels que le test MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA, sont comparables à ceux obtenus avec le test de fixation du complément¹⁵ mais ne corrélat pas avec les résultats du test des anticorps hétérophiles. En cas de MNI à EBV, les anticorps hétérophiles ne se développent pas chez environ 10-15% des adultes et dans une proportion encore plus élevée chez les enfants. Les anticorps hétérophiles sont rarement détectés chez les nourrissons atteints de MNI primaire à EBV.³ Par contre, les anticorps anti-EBV VCA se développent dans tous les cas d'infection à EBV et ne sont pas affectés par l'âge.¹³ Les anticorps hétérophiles ont une durée de vie courte tandis que les anticorps IgG anti-EBV persistent indéfiniment et peuvent être détectés par le test MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA comme une mesure du statut immunitaire.

ESPAÑOL



EBV VCA IgG IFA

Un ensayo de inmunofluorescencia para detectar anticuerpos de tipo EBV VCA IgG contra el virus de Epstein Barr

REF EB100

IVD

Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

R. Only

USO INDICADO

Un ensayo de inmunofluorescencia para detectar anticuerpos de tipo EBV VCA IgG contra el virus de Epstein Barr.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El virus de Epstein Barr (EBV) es reconocido como el agente etiológico de la mononucleosis infecciosa (MI). La infección por el EBV es común en las etapas tempranas de la infancia. La mayoría de estas infecciones en la niñez son asintomáticas o tan sólo presentan síntomas leves con producción de anticuerpos contra el EBV y desarrollo de inmunidad permanente. Las personas no inmunes que resultan infectadas durante la adolescencia, especialmente aquellas en grupos socio-económicos altos, por lo general presentan cuadros con sintomatología total de MI,¹ y esta es una de las enfermedades incapacitantes más frecuente de los adultos jóvenes.²

Las infecciones producidas por el EBV aparentemente están restringidas a las células linfoides.³ Al igual que los otros virus del género herpesvirus, el EBV establece un estado de portador persistente en el huésped.⁴ El genoma del EBV es transportado en los leucocitos periferales indefinidamente; por lo tanto, la transfusión de sangre de un donante inmune a uno no inmune produce una infección primaria que se conoce con el nombre de síndrome de MI post-perfusión.⁵ Los anticuerpos contra los antígenos del cápside viral (ACV) son los primeros en aparecer y los que predominan en el EBV.³ Estos se desarrollan en todos los pacientes con MI por EBV, linfoma de Burkitt y carcinoma nasofaríngeo.⁶ Títulos elevados de anticuerpos contra el ACV-EBV también son encontrados en algunos pacientes con enfermedad de Hodgkins, leucemia linfocítica crónica, lupus eritematoso sistémico, sarcoidosis y fiebre de Iuzumi.^{6, 7}

Mientras que el EBV es el agente etiológico de la MI, el Cytomegalovirus y el *Toxoplasma gondii* también producen una enfermedad similar a la MI, la cual por lo general no puede ser diferenciada de la MI por el EBV. El diagnóstico diferencial de la infección por el EBV es especialmente importante en aquellos pacientes que no presentan anticuerpos heterofílicos o que tienen características clínicas y hematológicas atípicas o enfermedad prolongada o recurrente.³

El ensayo de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFI) es una técnica serológica de gran valor tanto para la determinación del estado inmune como para la enfermedad activa. La seroconversión en el título de ACV-EBV, la presencia de anticuerpos IgM contra la cápside del EBV o un incremento significativo en los anticuerpos contra el cápside del EBV se consideran evidencia de infección activa por el EBV.⁸

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

El ensayo de MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA para detectar IgG contra el EBV utiliza el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Linfocitos de un paciente con linfoma de Burkitt son usados como sustrato del ACV. En esta ensayo, el suero del paciente es puesto a reaccionar con el sustrato, y en caso de que anticuerpos contra el EBV se encuentren presentes, éstos se unirán al sustrato antigénico y no serán eliminados. Posteriormente, cuando la IgG anti-humana conjugada con fluoresceína es añadida, ésta se unirá a los anticuerpos IgG, haciendo que las células infectadas con el EBV fluorescan cuando estas son observadas bajo un microscopio de fluorescencia.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

- Portaobjetos de sustrato AP-EBV (EBV-EA):** Recubiertos con células HR1 provenientes de un linfoma de Burkitt, fijadas en cada uno de los diez pocillos. Aproximadamente 10-20% de las células fijadas expresan el antígeno viral para facilitar su lectura y permitir un contraste óptimo. La infectividad de las células es eliminada por medio del proceso PsoralSafe™. Los portaobjetos empaquetados individualmente están listos para ser usados tan pronto son removidos de los paquetes de papel aluminio. Los portaobjetos almacenados entre 2-8 C son estables hasta la fecha descrita en el envase del portaobjetos. No use la lámina si el indicador del desecante (línea en el centro del desecante) ha cambiado de azul a rosa.
- Buffer 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 buffer de PBS rehidratado almacenado a una temperatura entre los 2-8 C es estable durante tiempo indefinido.
- 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 de anticuerpo IgG anti-humana (cabra) marcada con Fluoresceína, la cual debe reconstituirse con 3 mL de PBS. El conjugado contiene colorante de contraste, el cual ya viene pre-titulado para usar con cada kit. El conjugado reconstituido puede ser almacenado hasta dos semanas entre 2-8 C, o de otro modo puede ser alicuatado y almacenado hasta ocho meses a ≤ -20 C. Las alícuotas descongeladas no deberán volver a congelarse.
- Líquido de montaje:** Solución de líquido de montaje, el cual está tamponado a un pH de 8,0 y se compone de una combinación de glicerol y agua formulada 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 lavado.
- Agua destilada.
- Recipiente para tinción.
- Hisopos de algodón y toallas de papel absorbente.
- Cámara húmeda.
- Cubreobjetos N° 1 de 22 x 50 mm.
- 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.

ADVERTENCIAS

- 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 buffer 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, enjuáguela 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 en el refrigerador (entre 2-8 C).
- Después de reconstituidos los reactivos, el kit está listo para ser usado.
- 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.
- Los bolsos individuales de portaobjetos deberán mantenerse selladas hasta el momento justo antes de usarse.
- Tanto los reactivos como las portaobjetos con antígeno no deberán usarse después de la fecha de caducidad descrita.
- 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 recolectadas por venipunción deberán dejarse coagular a temperatura ambiente, y luego deberán ser centrifugadas. El suero deberá ser separado tan pronto como 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. Los congeladores con descongelación automática no son recomendados como unidades de almacenamiento. El uso de sueros que muestran hemólisis, lipemia o contaminación microbiana no es recomendado.

En caso de que el ensayo de MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA sea usado para diagnosticar enfermedad activa, sueros en pares deberán ser obtenidos y luego examinados al tiempo. El primer suero deberá ser obtenido lo más pronto posible después del comienzo de la enfermedad, y el segundo suero convaleciente deberá ser obtenido diez días después.

El suero deberá ser analizado a una dilución de 1:10. Todas las diluciones de suero deberán prepararse en PBS. Los sueros que al ser analizados a la dilución inicial de 1:10 resulten positivos, deberán ser titulados por medio de diluciones seriadas dobles.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Prepare una dilución 1:10 de suero del paciente utilizando PBS.
- Saque el portaobjetos del paquete de papel aluminio.
- Utilizando una pipeta Pasteur, añada la cantidad suficiente de suero diluido (aproximadamente 15 μ L) para recubrir cada pocillo.
- Coloque el portaobjetos en una cámara húmeda e incube a temperatura ambiente, durante 30 minutos.
- Enjuague brevemente con un chorro suave de solución de PBS (evitando dirigir el chorro de PBS directamente a los pocillos) y sumerja luego en PBS durante 5 minutos.
- Deje secar el portaobjetos al aire, colocando lo parado 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 pocillo (15 μ L).
- Incube a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 30 minutos.
- Enjuague y seque el portaobjetos como fue descrito en los pasos 5 y 6.
- Justo antes de leer, añada una cantidad suficiente de líquido de montaje a cada pocillo, de modo que todo el sustrato quede cubierto cuando el cubreobjetos sea colocado. Cubra con un cubreobjetos N 1 de 22 x 50 mm.
- NOTA: La adición de líquido de montaje en exceso puede causar un movimiento excesivo del cubreobjetos. De otro modo, la adición insuficiente del mismo puede hacer que parte del sustrato sea imposible de leer.
- Lea el portaobjetos tan pronto como sea posible a una magnificación de 150X a 200X.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La reacción se considera POSITIVA cuando el 10-20% de las células en cada campo visual exhiben fluorescencia de color amarilla-verdosa. Las demás células proporcionan un fondo de contraste de color rojo. El título de anticuerpo IgG EBV 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 o mayor indica que el paciente ha sido expuesto previamente al EBV.

La reacción se considera NEGATIVA cuando las células no fluorescen de color amarillo verdoso sino que aparecen de color rojas debido al colorante de contraste o exhiben menos de 1+ de reacción en la dilución de tamizaje. Una reacción negativa a una dilución inicial en que se hizo el ensayo indica la ausencia de anticuerpos detectables de tipo IgG contra el EBV.

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 procesarse cada vez que el ensayo sea realizado.

El control Negativo debe exhibir una reacción menor de 1+ a una dilución de 1:10.

El Suero Control Positivo es titulado para proporcionar un estándar para chequear la sensibilidad del ensayo. Éste deberá exhibir una reacción positiva fuerte a la dilución inicial en que se hizo el ensayo 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 los casos de mononucleosis clásica, los anticuerpos de tipo IgG contra el EBV se desarrollan temprano, alcanzan un pico dentro de pocas semanas y luego disminuyen lentamente hasta niveles bajos que persisten indefinidamente.¹¹ Un incremento en el título de anticuerpos cuádruple o mayor se considera diagnóstico de enfermedad activa. Sin embargo, un incremento significativo en el título tan sólo es observado en menos del 20% de los pacientes, ya que los títulos hacen un pico por lo general antes de que la muestra de la fase aguda sea obtenida.³

Las mujeres y los niños a los cuales les han extraído las amígdalas desarrollan títulos mayores contra el EBV que los hombres y los niños con amígdalas. Niveles de títulos altos también son desarrollados en personas con historias de neumonía o infecciones del tracto urinario.¹² Un incremento tardío en el título, el cual puede exceder 2560 es el resultado de enfermedad secundaria como linfoma de Burkitt o carcinoma nasofaríngeo.^{13, 14} Tanto el título de anticuerpos contra el EBV, como el de anticuerpos heterófilos no son representativos de la severidad de los síntomas clínicos en la MI.¹¹

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los anticuerpos antinucleares presentes en el suero pueden interferir con el ensayo de MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA. Sin embargo, el patrón de tinción difuso, reticular o periférico que es producido por los anticuerpos antinucleares se distingue fácilmente ya que éste es opaco e involucra la mayoría de las células.⁹ El patrón de tinción homogéneo del anticuerpo de tipo IgG involucra tan sólo el 10-20% de las células.
- Los títulos finales pueden variar dependiendo de varios factores como por ejemplo del tipo de microscopio, de la fuente de luz, del tiempo de uso de la lámpara y del sistema de filtros usados para leer las reacciones.
- Un título de una sola muestra de suero es de valor diagnóstico limitado en la determinación de enfermedad activa. Los títulos persistentes de anticuerpos pueden ser malinterpretados en pacientes que más tarde son infectados con otros agentes; especialmente en aquéllos en los cuales la infección original con el EBV no fue diagnosticada.¹⁰ Además, el rango superior de los títulos de anticuerpos persistentes en sueros convalescentes coincide con el rango inferior de los títulos máximos que se presentan en las fases agudas.³ En aquellos casos en los cuales el diagnóstico de enfermedad activa se base en el análisis de sólo una muestra de suero se recomienda utilizar el ensayo de MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA de Meridian.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

El ensayo de MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA es un método sensible y rápido para la determinación del estado inmune. También tiene valor en el diagnóstico de la enfermedad activa al examinar sueros obtenidos en la etapa aguda junto con aquellos obtenidos en la etapa convalescente, para la determinación de seroconversiones o incrementos significativos en el título de anticuerpo. La sensibilidad de cada lote de kits es controlada examinando con suero de referencia para asegurar que los resultados sean reproducibles con una variación de un título. El ensayo es específico para anticuerpos contra el EBV y los títulos no son afectados por otros virus que causan fiebres entre ellos el coxsackievirus, adenovirus, myxovirus y otros herpesvirus.¹¹

Los resultados de las ensayos de AIF, como el ensayo de MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA, son comparables a aquellos obtenidos en las ensayos de fijación de complemento,¹⁵ pero no se correlacionan con aquellos obtenidos en el ensayo de anticuerpos heterófilos. En los casos de MI asociada con el EBV los anticuerpos heterófilos no se desarrollan más o menos en un 10-15% de los adultos, y aún en un porcentaje mayor en los niños. El anticuerpo heterófilo rara vez es detectado en infantes con MI primaria asociada con el EBV.³ Por el contrario, el anticuerpo contra el ACV-EBV es desarrollado en todas las infecciones causadas por el EBV y éste no es afectado por la edad.¹³ El anticuerpo heterófilo tiene una vida corta, mientras que el anticuerpo de tipo IgG contra el EBV persiste indefinidamente y puede ser detectado por el ensayo de MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA como una medida para evaluar el estado inmune.

DEUTSCH

MERIFLUOR®

EBV VCA IgG IFA

Indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das Epstein-Barr-Virus

REF EB100

IVD In-vitro-Diagnostikum

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das Epstein-Barr-Virus.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Das Epstein-Barr Virus (EBV) verursacht die infektiöse Mononukleose (IM). Infektionen mit EBV im frühen Kindesalter sind normal. Die meisten dieser Infektionen im Kindesalter verlaufen asymptomatisch oder mild; mit der Entwicklung von EBV-Antikörpern und permanenter Immunität. Personen, die erst als junge Erwachsene infiziert werden, speziell jene der höheren sozioökonomischen Schichten, entwickeln im allgemeinen eine ausgeprägte symptomatische IM.¹ Die IM ist eine der bedeutendsten, schwerverlaufenden Erkrankungen junger Erwachsener.²

Durch EBV verursachte Infektionen scheinen auf die lymphoiden Zellen beschränkt zu sein.³ Ähnlich anderen Herpesviren persistieren die Epstein-Barr-Viren im Körper,⁴ und das EBV-Genom liegt lebenslang in den peripheren Leukozyten vor. Bluttransfusionen von einem immunisierten Spender auf einen nichtimmunen Empfänger lösen eine Primärfektion aus: das IM Postperfusion Syndrom.⁵ Antikörper gegen das virale Capsid-Antigen (VCA) herrschen vor und sind die am frühesten nachweisbaren Antikörper bei einer EBV-Infektion.³ Sie werden in allen Patienten mit EBV-IM, Burkitt Lymphomen und Nasopharynxkarzinomen gebildet.⁶ Erhöhte Antikörpertiter gegen EBV-CA werden auch in Patienten mit der Hodgkin Krankheit, chronisch-lymphatischen Leukämien, Systemischem Lupus Erythematodes, Sarkoidosen und Izumi Fieber nachgewiesen.^{6,7}

Während das EBV die infektiöse Mononukleose verursacht, entwickeln Cytomegalie-Viren und *Toxoplasma gondii* IM-ähnliche Erkrankungen, die oft klinisch nicht von der EBV-IM zu unterscheiden sind. Die Differenzialdiagnose einer EBV-Infektion ist besonders wichtig für jene Patienten, die für heterophile Antikörper negativ sind, atypische und hämatologische Besonderheiten oder persistierende oder reaktivierende Infektionen aufweisen.³

Der indirekte Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFT) ist wichtig sowohl zur Bestimmung des Immunstatus als auch zum Nachweis einer akuten Infektion. EBV-CA Serokonversion, Anwesenheit von EBV-Capsid-IgM-Antikörpern oder ein signifikanter Anstieg der EBV-Capsid-Antikörper gelten als Beweis für eine akute EBV-Infektion.⁹

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Im MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test wird indirekte Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFT) angewendet. Lymphozyten von Patienten mit Burkitt-Lymphom werden als VCA-Antigen verwendet. Diese EBV-infizierten Zellen sind auf den Objektträger fixiert und werden mit Patientenseren beschichtet. Vorhandene Antikörper binden sich an die viralen Antigene und werden durch den Waschvorgang nicht abgewaschen. Die Antigen-IgG-Komplexe werden durch die Zugabe von Fluoreszein markiertem Anti-Human-IgG sichtbar gemacht. Im positiven Fall zeigt sich beim Betrachten durch das Fluoreszenzmikroskop eine spezifische zytoplasmatische, nukleare hellgelbe bis grüne Fluoreszenz der EBV-infizierten Zellen.

REAGENZEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

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

- EBV antigenbeschichtete Objektträger:** Mit darauf fixierten HR1 Burkitt Lymphozyten. Ca. 10-20% der Zellen exprimieren das virale Antigen und erlauben damit ein leichtes Ablesen der Ergebnisse und einen optimalen Kontrast. Die Objektträger sind durch den PorsalSafe™ Prozeß nicht infektiös. Nach Entfernen der Verpackung sind die Objektträger gebrauchsfertig. Ungeöffnete Objektträgerpackungen 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 Phosphatpuffer 0,01 M, pH-Wert 7,5, enthält Natriumazid. Die Lösung wird bei 2-8 C gelagert und ist unbegrenzt 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), das mit 3 mL PBS rekonstituiert wird. Es ist vortitriert und enthält 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 Glycerin-Wasser-Gemisch (pH 8,0). Das Gemisch ist so eingestellt, daß die Elution der Gegenfärbung minimiert ist. Das Eindeckmittel ist gebrauchsfertig.

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
- Fluoreszenzmikroskop, FITC Blaulichtfiltersystem Sperrfilter (515 nm) oder ein vergleichbares Filtersystem zur Bestimmung des Fluoreszeins wird ebenso für die Durchlichtmikroskopie mit Dunkefeldkondensator 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, das mit Blei- oder Kupferrohren reagiert und zu potentiell explosiven Metallazid-Verbindungen führen kann. Für die Beseitigung der natriumazidhaltigen Reagenzien sollten größere Mengen Wasser benutzt werden, um eine Metallazidbildung im Abfluß 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 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 definiert durch erforderliche FDA lizenzierte Tests. 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 Microbiological 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.
- Werden rekonstituiertes Konjugat und rekonstituierte Seren bei ≤ -20 C gelagert, sind Gefrierschränke mit Abtauautomatik zur Lagerung ungeeignet.
- Einzelne Objektträger erst kurz vor Gebrauch aus der Verpackung herausnehmen.
- Reagenzien und Objektträger dürfen nach dem aufgedruckten Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden.
- 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 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. Gefrierschränke mit Abtauautomatik sind zur Lagerung ungeeignet. Hämolytische, lipämische oder mit Mikroorganismen kontaminierte Seren sollen nicht verwendet werden.

Wird der MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test zur Diagnose einer akuten Infektion eingesetzt, sollten Serumproben entnommen und zusammen getestet werden. Die erste Serumprobe sollte möglichst kurz nach dem Ausbruch der Infektion und die zweite Probe ca. 10 Tage später entnommen werden.

Die Seren sollten mit einer 1:10 Verdünnung untersucht werden. Setzen Sie alle Serumverdünnungen mit PBS an. Seren, die mit der Screeningverdünnung positiv reagieren, können in zweifachen Verdünnungen auswertet werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

- Patientenseren 1:10 in PBS verdünnen.**
- Objektträger aus der Folie nehmen.
- Mit Hilfe einer Pasteurpipette vorschriftsmäßig verdünnte Seren (ca. 15 μ L) auf die Antigenfelder auftragen, so daß die gesamten Auftragsstellen gerade ausreichend bedeckt sind.
- Objektträger in die feuchte Kammer legen, 30 min. bei Raumtemperatur inkubieren.
- Objektträger kurz mit PBS abspülen (den Strahl nicht direkt auf die Auftragsstelle richten), anschließend Objektträger 5 min. in PBS stellen.
- Objektträger auf ein absorbierendes Tuch stellen und lufttrocknen lassen.
- Den Raum zwischen den Auftragsstellen mit einem mit destilliertem Wasser getränkten Wattestäbchen trocknen.
- Ca. 15 μ L Konjugat auf die Antigenfelder auftragen, so daß sie gerade ausreichend bedeckt sind.
- Objektträger in der feuchten Kammer 30 min. bei Raumtemperatur 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 die Antigenfelder vollständig abgedeckt werden. Mit einem 22 x 50 mm Deckglas, Nr. 1 Deckgläschen abdecken.**
- Achtung:** Zugabe von überschüssigem Eindeckmittel kann ein verstärktes Bewegen des Deckgläschens verursachen. Zu wenig Eindeckmittel kann zur Unlesbarkeit von Teilen der Antigenfelder führen.
- Ergebnisse so bald wie möglich bei einer 150-200-fachen Vergrößerung auswerten.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Das Ergebnis ist positiv, wenn die infizierten Zellen in jedem Feld (ca. 10-20% der Zellen) eine deutliche grüneliche Fluoreszenz zeigen. Die restlichen Zellen erscheinen als roter Hintergrund. Der EBV-IgG-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 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 aufweisen. Ein negatives Ergebnis mit der Screening-Verdünnung deutet auf keine nachweisbaren IgG-Antikörper gegen EBV hin.

QUALITÄTSKONTROLLE

Den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen 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 ungültig.

Liegen die Werte für die Positiv- oder 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. Testergebnisse sollten nicht weitergeleitet werden, solange die Testbedingungen nicht korrigiert wurden.

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.

ERWARTETE WERTE

Bei der klassischen infektiösen Mononukleose werden IgG-Antikörper gegen EBV sehr früh gebildet, erreichen ihren höchsten Titer innerhalb weniger Wochen und fallen dann langsam auf niedrigere Titer ab, die lebenslang persistieren.¹¹ Wird ein vierfacher oder noch höherer Titeranstieg gemessen, liegt eine akute Erkrankung vor. Hierbei ist zu beachten, daß ein solcher Titeranstieg nur in weniger als 20% der Patienten beobachtet wird, da diese sehr hohen Titer oft erreicht werden, bevor eine Serumprobe entnommen wurde.³

Frauen und tonsillektomierte Kinder entwickeln oft höhere Titer gegen EBV als Männer und nicht-tonsillektomierte Kinder. Höhere EBV-Antikörpertiter werden auch von Personen, die Pneumonien oder Harnwegsinfektionen in ihrer Krankengeschichte aufweisen, nachgewiesen.¹² Ein späterer Anstieg des Titers, der 2560 überschreiten kann, ist das Ergebnis einer sekundären Erkrankung wie z.B. das Burkitt-Lymphom oder das Nasopharynxkarzinom.^{13, 14} Die Höhe der Antikörpertiter gegen EBV sowie der heterophilen Antikörper geben keine Auskunft über die Schwere der klinischen Symptome.¹¹

EINSCHRÄNKUNGEN

- Anti-nukleare Antikörper im Serum können den MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test beeinflussen. Sie verursachen eine diffuse, retikuläre oder periphere Färbung, die von der matten Färbung fast aller Zellen leicht zu differenzieren ist.⁹ Die durch die EBV-IgG-Antikörper verursachte homogene Färbung zeigt sich dagegen nur bei den 10-20% der mit EBV-Infizierten Zellen.
- Endpunkttiter können aufgrund des verwendeten Mikroskoptyps, der Lichtquelle, Alter der Lichtquellen und des eingesetzten Filtersystems variieren.
- Die Titerangabe einer einzelnen Serumprobe hat für eine akute Erkrankung nur einen begrenzten diagnostischen Aussagewert. Persistierende EBV-IgG-Antikörpertiter können bei Patienten, die sich später mit anderen Erregern infizieren, falsch interpretiert werden, besonders, wenn die frühere EBV-Infektion nicht diagnostiziert wurde.¹⁰ Persistierende konvaleszente EBV-Antikörpertiter können sehr hoch liegen und damit die niedriger liegenden maximalen Titer der akuten Phase überdecken.³ Der MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test wird daher empfohlen, wenn die Diagnose einer akuten Erkrankung anhand einer einzigen Serumprobe erstellt werden muß.

LEISTUNGSMERKMALE

Bei vorschriftsmäßiger Durchführung stellt der MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test ein sensitives und schnelles Verfahren für den Nachweis von Antikörpern gegen EBV dar. Er ist auch hervorragend für die Diagnose einer akuten Erkrankung geeignet, wenn Serumpaare während der akuten Phase und der konvaleszenten Phase untersucht werden, um eine Serokonversion oder einen signifikanten Titeranstieg zu diagnostizieren. Die Sensitivität jeder Charge wird mit Referenzseren getestet, um reproduzierbare Ergebnisse innerhalb einer Röhrenverdünnungsreihe zu gewährleisten. Der MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test ist spezifisch für Antikörper gegen EBV, und die Titer werden nicht durch andere feberauslösende Viren, wie z. B. durch Coxsackie-Viren, Adenoviren, Myxoviren und andere Herpesviren beeinflusst.¹¹

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenztests, wie z. B. der MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test sind mit denen der Komplementfixation¹⁵ vergleichbar, korrelieren jedoch nicht mit den Ergebnissen des heterophilen Antikörpertests. In ca. 10-15% der EBV-IM bei Erwachsenen und in noch höheren Prozentsätzen bei Kindern werden keine heterophilen Antikörper entwickelt. Bei Kindern mit primärer EBV-IM werden ebenfalls nur selten heterophile Antikörper nachgewiesen.³ Demgegenüber werden bei allen EBV Infektionen, unabhängig vom Alter, EBV-VCA-Antikörper gebildet.¹³ Heterophile Antikörper sind kurzlebig; EBV-IgG-Antikörper persistieren dagegen lebenslang und können mit dem MERIFLUOR EBV VCA IgG IFA Test zur Bestimmung des Immunstatus nachgewiesen werden.

REFERENCES

- Epstein MA and Achong BG. The Eb Virus. Annual Rev. Microbiol. 1973;27: 413-36.
- Henle G and Henle W. EB Virus in the Etiology of Infectious Mononucleosis. Hospital Practice, July 1970; pp 33-41.
- Henle W, Henle G and Horowitz CA. Epstein-Barr Virus Specific Diagnostic Tests in Infectious Mononucleosis. Human Pathol. 1974;5: 551-65.
- Henle W and Henle G. Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis. N. Engl. J. Med. 1973;288: 263-64.
- Henle W, et al. Antibodies to Early Antigens Induced by Epstein-Barr Virus in Infectious Mononucleosis. J. Infect. Dis. 1971;124: 58-67.
- Henle W and Henle G. Epstein-Barr Virus-Related Serology in Hodgkin's Disease. Natl. Cancer Inst. Monogr. 1973;36: 79-84.
- Nishioka K, et al. An Outbreak of a Febrile Disease (Izumi Fever) Associated with High Anti-EB Virus Antibody Titers. Japan J. Exp. Med. 1973;43: 201-07.
- Chang RS. Infectious Mononucleosis. G. K. Hall. Boston. 1980: p93.
- Evans AS. E. B. Virus Antibody in Systemic Lupus Erythematosus. Lancet 1971;1: 1023-24.
- Nikoskelainen J, Klemola E, and Leikola J. Epstein-Barr Virus-IgM Antibody Test in Infectious Mononucleosis. J. Infect. Dis. 1976;134: 313-14.
- Niederman JC, et al. Infectious Mononucleosis: Clinical Manifestations in Relation to EB Virus Antibodies. JAMA 1968;203: 205-09.
- Sumaya CV, et al. Seroepidemiologic Study of Epstein-Barr Virus Infections in a Rural Community. J. Infect. Dis. 1975;131: 403-08.
- Evans AS. The Spectrum of Infections with Epstein-Barr Virus: A Hypothesis. J. Infect. Dis. 1971;124: 330-35.
- Goldman JM, Goodman ML and Miller D. Antibody to Epstein-Barr Virus in American Patients with Carcinoma of the Nasopharynx. JAMA 1971;216: 1618-22.
- Gerber P, et al. Infectious Mononucleosis: Complement-Fixing Antibodies to Herpes-like Virus Associated with Burkitt Lymphoma. Science 1968;161: 173-75.

 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: +33 (0) 67 89 59 59
Fax: +33 (0) 67 89 59 58
Email: info.bn@meridianbioscience.eu








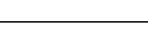

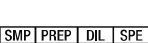





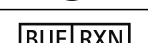

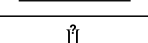

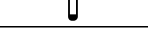

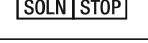

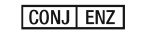








Meridian Bioscience Europe France
34 rue de Ponthieu - 75008 Paris
FRANCE
Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40
Fax: +33 (0) 1 97 06 62 10
Email: info.fr@meridianbioscience.eu

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 jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis		Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung		Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo medico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum		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.		Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione 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 Probenverdünnungspuffer befindet
	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence ou catalogue / Número 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		Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Solo para evaluación del funcionamiento / Nur für IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen		Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung		Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Coniugado enzimático / Coniugado enzimático / Enzymkonjugat
	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer		Assay Control / Contrôle del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät		Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstelldatum		Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenza / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
	Conjugate / Coniugato / Coniugado / Coniugado / Konjugat		Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat		Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
	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 el orden de licenciados en la práctica del cuidado de la salud. / Vorsicht: Der Verkauf oder die Verschreibung dieses Geräts durch einen zugelassenen Arzt unterliegt den Beschränkungen des US Bundesgesetzes.		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.



SN11740

REV. 02/16