



EBV VCA IgM IFA

An Immunofluorescence Test for the Detection of
IgM Antibodies to Epstein-Barr Virus

REF EB150

IVD

Rx Only

INTENDED USE

The MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Test is a sensitive and rapid immunofluorescence method for the qualitative detection of antibodies to the Viral Capsid Antigen (VCA) of Epstein-Barr virus (EBV) in human serum. It is of value in providing supportive information for the diagnosis of active infection with EBV.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Epstein-Barr virus is perhaps the most common and widely disseminated human virus. Virtually everyone acquires antibodies to EBV with advancing age.¹ Responses to primary EBV infection range from subclinical infection in children less than two years to severe debilitating disease in young adults. The predominant symptomatic disease of EBV infection is infectious mononucleosis (IM). IM has an insidious onset with headache, sore throat, fever, enlarged cervical lymph nodes, splenomegaly, malaise, and some form of pharyngitis. Abnormal liver function is more marked with EBV mononucleosis than CMV mononucleosis and must be considered in the differential diagnosis of hepatitis.² Other EBV-induced disease can involve the neurologic, cardiac, ocular, respiratory, hematologic, digestive, and renal systems. Neurologic syndromes associated with EBV infection include meningitis, encephalitis, Guillain-Barré syndrome, Bell's palsy, myelitis, cranial nerve neuritis, and psychotic disorders. Bulbar involvement with ensuing respiratory paralysis can be fatal.³ EBV is also associated with Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma.¹

Many viral antigens are released in EBV infection. Viral capsid antigens (VCA) not only appear first but also develop in all cases of EBV infection. Since IgM to EBV capsid antigen is the acute phase antibody, it is the antibody of choice for detection of active disease. Serology is the only means to identify EBV infection in the absence of typical diagnostic symptoms of IM. Likewise, EBV serology is important in diagnosing infection in young children since they usually do not develop typical IM symptoms or heterophil antibodies.⁴

BIOLOGICAL PRINCIPLES

The indirect fluorescent antibody (IFA) method is used in the MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Test. Patient serum is reacted with the Burkitt's lymphocytic-cell substrate and if IgM antibodies to the viral capsid antigen of EBV are present they will bind to the antigen substrate and not rinse off. Subsequently, when fluoresceinated antihuman IgM is added to the reaction site, it will bind to the IgM 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 to 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. When rehydrated, the PBS is a 0.01 M phosphate buffer with pH of 7.5 and contains sodium azide. Rehydrated PBS stored at 2-8 C is stable indefinitely.
- Control Sera (See WARNINGS, step 4):** Lyophilized. Each control serum is reconstituted with 1 mL PBS to give a 1:10 working dilution. The reconstituted sera are stable for 6 weeks at 2-8 C or 8 months at ≤ -20 C. The Positive Control is human serum containing IgM antibodies to EBV. The titer is stated on the label.
- Conjugate:** Lyophilized. Fluorescein-labeled anti-human IgM, (goat), is reconstituted with 2 mL of PBS. The conjugate contains counterstain and is pretitered 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 pipettes
- Volumetric flask, 1 liter
- Wash bottle
- Distilled water
- Staining dish
- Cotton-tipped swabs, absorbent towels
- Moist chamber
- Cover slips, No. 1, 22 x 50 mm
- 37 C Incubator
- Fluorescence microscope. A FITC blue light excitation filter and a 515 nm barrier filter, or any comparable filter system, is suggested for transmitted-light microscopy using a darkfield condenser and for incident-light microscopy using a 500 nm dichroic mirror.

PRECAUTIONS

All reagents are for in vitro diagnostic use only.

WARNINGS

- The conjugate contains Evans Blue dye as a counterstain. This dye may be carcinogenic. Avoid contact with the skin.
- The PBS Powder contains sodium azide, which may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azide compounds. When disposing of reagents through plumbing fixtures, flush with a large volume of water to prevent azide build-up in drains.
- Sodium azide is very toxic in case of ingestion. In contact with acid it emits a very toxic gas. In case of contact with the skin wash immediately and abundantly with water.
- Handle specimens, Controls and the materials that contact them as potential biohazards. The source materials used to prepare the control reagents were tested at the donor level and found to be nonreactive for the antigens or nuclear materials associated with, or antibodies to, the following viruses, as defined by required FDA-licensed tests: Human immunodeficiency viruses Types 1 and 2, Hepatitis B virus and Hepatitis C virus. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, these materials should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended in the CDC/NIH "Biosafety and Microbiological and Biomedical Laboratories".

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

	Signal Word
  PBS Powder	Danger Hazard Statements H301 – Toxic if swallowed H310 – Fatal in contact with skin H411 – Toxic to aquatic life with long lasting effects Contains Sodium azide Precautionary Statements - EU (§28, 1272/2008) P301 + P310 – IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/ physician P321 – Specific treatment (see .? on this label) P280 – Wear eye protection/ face protection P361 – Remove/Take off immediately all contaminated clothing P322 – Specific measures (see .? on this label)

SHELF LIFE AND STORAGE

- The expiration date is indicated on the kit label. Store the kit at 2-8 C and return the kit promptly to the refrigerator after each use.
- 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.
- Incubation times and temperatures other than those specified, may give erroneous results.
- The components of this kit have been tested and standardized as a unit. Use of components from other lots or other manufacturers may yield unsatisfactory results.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Blood obtained 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 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.

Screening dilutions of 1:10 and 1:40 are recommended for testing unless a serum pretreatment procedure is employed to remove interfering IgG (e.g., GullSORB™ IgG Inactivation Reagent, Product No. XX715). If the serum is pretreated with GullSORB, only the resulting 1:10 dilution need be tested. Other methods of serum pretreatment may require additional screening dilutions.

TEST PROCEDURE

1. Prepare screening dilution(s) of the patient serum with PBS or use pretreated serum.
2. Remove slide from foil packet.
3. Using a Pasteur pipette, add just enough appropriately diluted serum (approximately 15 µL) to cover each reaction site.
4. Place the slide in a moist chamber and incubate at 37 C for 90 minutes.
5. Rinse slide briefly with a gentle stream of PBS (avoid directing PBS at wells) and then immerse in PBS for 5 minutes.
6. Air dry the slide by standing on end on absorbent toweling.
7. Wipe between wells with a cotton-tipped swab moistened with distilled water.
8. Add just enough conjugate (approximately 15 µL) to cover each reaction site.
9. Incubate the slide at 37 C in a moist chamber for 30 minutes.
10. Rinse and dry the slide as described in Steps 5 and 6.
11. 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.
12. Read the slide as soon as possible at 150X to 200X magnification.

INTERPRETATION OF RESULTS

The reaction is POSITIVE when 10 to 20% of the cells in each field exhibit a greenish-yellow fluorescence. The remaining cells provide a contrasting red background. A positive reaction at a 1:10 or greater dilution is indicative of a current EBV infection. It is not necessary to titrate positive sera in the MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Test. (See LIMITATIONS OF THE PROCEDURE to rule out false positives due to rheumatoid factor).

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(s) indicates no detectable IgM antibody to EBV.

QUALITY CONTROL

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

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

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

The positive control serum should be titered to provide a standard for checking test sensitivity. It should exhibit a 1+ reaction at its stated titer and increase to a strong positive reaction at the 1:10 dilution. A day-to-day variance of one two-fold dilution on either side of the stated titer is considered acceptable performance. A reaction of less than 2+ at the 1:10 dilution may indicate the test is not functioning within specifications.

If the test run is invalid because the Positive or Negative Control values do not fall within the limits specified, repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If 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

A positive result at a screening dilution of 1:10 (after RF interference has been ruled out) indicates an active (primary) EBV infection. IgM to EBV capsid is produced in all primary EBV infections, whether symptomatic or asymptomatic. Peak IgM titers in patients with diagnosed EBV infection range from a low of 40 to as high as 1280 with the MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Test. IgM antibodies decline rapidly to undetectable levels in 8-10 weeks.⁴

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. Immune IgG in the test sample can cause false negatives by competing with EBV-specific IgM for substrate binding sites. Immune IgG can also cause false positives by forming immune complexes with the antigen substrate which can then bind IgM-class rheumatoid factor (IgM-RF). Routine RF tests may not detect small amounts of IgM-RF which are recognized by the more sensitive IA technique. Therefore, serum samples intended for EBV IgM IFA Testing should be pretreated (e.g., GullSORB™ reagent, Product No. XX715) to eliminate immune IgG and RF interference.
2. IgM anticell antibodies, if present in the serum, may interfere with the MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Test. However, this interference is easily discerned since the staining produced by EBV-specific antibodies involves only the EBV infected cells (approximately 15%).
3. Endpoint titers can vary depending on the type of microscope, light source, age of bulb, and filter system used to read the reactions.
4. Due to the innate ability of HR1 lymphocytes to synthesize IgM in vitro, some lots of slides will exhibit a faint background fluorescence. This staining consists of unevenly distributed fluorescing dots seen within the majority of cells. This stippled staining, when it appears, is easily distinguished from the relatively uniform, whole-cell fluorescence produced by immune IgM to EBV, because the number of fluorescing cells and the fluorescent intensity, do not look like the positive control at the stated titer.
5. Serum samples with high IgM antibody titers to Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus may demonstrate a non-specific reaction at the 1:10 dilution.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

When performed according to instructions, the MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Test is a sensitive and rapid method for diagnosing EBV infection. The sensitivity of each kit lot is controlled by testing with reference sera to ensure reproducible results. Clinical studies of the MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Test showed a 96% sensitivity and 100% specificity for IgM antibody to EBV capsid antigen.⁵

Tests for heterophil antibody and IgG antibody to EBV have inherent limitations in the rapid diagnosis of active disease, since they measure antibodies which develop more slowly and persist for longer periods of time. This antibody persistence can create confusion in patients later infected with other agents, especially when the original EBV infection was not diagnosed.⁶ IgM testing resolves the heterophil false positive responses and the false negative problem in children.⁴ Because IgG VCA titers are frequently at their peak at the time the first serum specimen is taken, diagnosis of IM by seroconversion or by demonstrating a rise in titer is unlikely. Likewise, diagnosing active disease by the IgG titer of a single serum specimen is difficult since the upper range of persisting convalescent titers overlaps with the lower range of maximal titers obtained in the acute phase of IM.⁷ Since IgM is present only in current disease, the MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Test requires only a single serum specimen, positive sera do not need to be titered, and results can be simply reported in terms of presence or absence of immune IgM.

merifluor®

EBV VCA IgM IFA

**Test in immunofluorescenza per la ricerca di Anticorpi IgM
anti-Virus di Epstein-Barr**

REF EB150

IVD

Rx Only

FINALITÀ D'USO

Il Test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA è un metodo rapido e sensibile di immunofluorescenza per la determinazione qualitativa degli anticorpi dell'antigene del Capside Virale (VCA) del virus di Epstein-Barr (EBV) nel siero umano. Il Test rappresenta un valido aiuto nel fornire informazione di supporto per la diagnosi dell'infezione attiva da EBV.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è probabilmente il virus umano più comune e diffuso. Virtualmente la maggior parte della popolazione viene esposta ed acquisisce gli anticorpi prima dell'età adulta.¹ La sintomatologia causata da un'infezione primaria da EBV varia da forme asintomatiche nei bambini di età inferiore ai due anni fino a forme severe e debilitanti nei giovani adulti. La forma sintomatica predominante dell'infezione da EBV è costituita dalla mononucleosi infettiva (MI). La MI ha un esordio insidioso, con cefalea, faringodinia, febbre, ingrossamento dei linfonodi latero-cervicali, splenomegalia, malessere generalizzato ed alcune forme di faringite. Alterazioni della funzionalità epatica sono più marcate nella MI causata da EBV rispetto a quella da CMV e devono essere prese in considerazione nella diagnosi differenziale di epatite.² Altre patologie causate da EBV possono coinvolgere il Sistema Nervoso Centrale, cuore, occhi, apparato respiratorio, sangue, apparato digestivo e renale. Le sindromi neurologiche associate ad EBV comprendono menigitis, encefalite, sindrome di Guillain-Barré, paralisi di Bell, mielite, nevralgia dei nervi cranici e turbe psicotiche. Il coinvolgimento bulbare può essere fatale in seguito a paralisi respiratoria progressiva.³ EBV è anche l'agente eziologico del linfoma di Burkitt e del carcinoma naso-faringeo.⁴

Durante l'infezione da EBV vengono rilasciati numerosi antigeni. Gli antigeni del capsode virale (VCA) non solo compaiono per primi ma sono presenti anche in tutti i casi di infezione da EBV. Poiché le IgM anti-VCA di EBV sono gli anticorpi presenti durante la fase acuta, esse rappresentano l'anticorpo più comunemente ricercato per diagnosticare un'infezione acuta. La sierologia è l'unico mezzo per diagnosticare l'infezione da EBV in assenza della sintomatologia clinica tipica di MI. Generalizzando, la sierologia per EBV è importante nella diagnosi delle infezioni nei bambini piccoli, poiché essi non presentano i sintomi tipici di MI e/o non producono anticorpi eterofili.⁴

PRINCIPALI BIOLOGICI

Il test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA per le IgM 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 IgM anti-VCA di EBV, essi si legano all'antigene e non vengono rimossi dal lavaggio. Pertanto, quando un siero anti-IgM umane marcato con fluoresceina viene aggiunto nei pozzetti di reazione, esso si lega alle IgM 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.

1. **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 resi non infettive mediante il processo PsoralSafe™. I vetrini, confezionati singolarmente, sono pronti all'uso. I vetrini non utilizzati sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservati a 2-8 °C. Non usare il vetrino se lo stabilizzatore di umidità (linea al centro dello stabilizzatore) è cambiato da blu a rosa.
2. **Tamponi Fosfato (polvere PBS):** Portare a 1 L con acqua distillata. Si ottiene così una soluzione 0.01 M di tamponi fosfato, pH 7.5, contenente sodio azide. Se conservato a 2-8 °C, il PBS reidratato è stabile indefinitamente.
3. **Sieri di Controllo (Vedere AVVERTENZE al punto 4):** Liofilizzati. Ciascun siero di controllo (umano) deve essere ricostituito con 1 mL di PBS per preparare la soluzione di lavoro 1:10. I sieri di controllo ricostituiti sono stabili per 6 settimane a 2-8 °C oppure per 8 mesi a ≤ -20 °C. Il Controllo Positivo: contiene IgM umane anti-EBV. Il titolo anticorpale del Controllo Positivo è stampato sull'etichetta del flaconcino.
4. **Coniugato:** Liofilizzato. Siero (di capra) anti-IgM umane marcato con fluoresceina: deve essere ricostituito con 2 mL di PBS. Il coniugato contiene colorante di contrasto ed è standardizzato per l'uso con ciascun lotto del kit.
5. **Fluido di montaggio:** Il fluido di montaggio è una combinazione glicerolo-acqua, tamponata a pH 8.0, formulata per minimizzare l'elusione del colorante di contrasto. È pronto all'uso.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Materiale di laboratorio per sierologia: provette 12 x 75 mm, porta provette, pipette per sierologia e pipette Pasteur
2. Beuta da 1 Litro
3. Spruzzetta per lavaggi
4. Acqua distillata
5. Supporto per colorazioni
6. Tamponi in cotone, tovaglioli assorbenti
7. Camera umida
8. Vetrini coprioggetto, n. 1, 22 x 50 mm
9. Termostato a 37 °C
10. 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

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

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

  PBS Powder	Avvertenza Pericolo Indicazioni di pericolo H301 – Tossico se ingerito H310 – Letale per contatto con la pelle H411 – Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata contiene Sodium azide Consigli di prudenza – UE (§28, 1272/2008) P301 + P310 – IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIPOISON o un medico P321 – Trattamento specifico (vedere .? su questa etichetta) P280 – Indossare protezione per occhi/ protezione facciale P361 – Togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati P322 – Misure specifiche (vedere .? su questa etichetta)
---	---

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

1. La data di scadenza è indicata sull'etichetta del kit. Conservare il kit a 2-8 °C e riporlo in frigorifero immediatamente dopo l'utilizzo.
2. Una volta ricostituiti i reagenti il kit è pronto all'uso.
3. Se si intende conservare a ≤ -20 °C i sieri ed il coniugato ricostituito si deve evitare l'impiego di congelatori dotati di funzione no-frost.
4. Le buste singole contenenti i vetrini devono rimanere sigillate fino al momento dell'uso.
5. I reagenti ed i vetrini con l'antigene non devono essere usati oltre la data di scadenza.
6. Tempi e temperature di incubazione diversi da quelli indicati possono dare risultati errati.
7. I componenti di questo kit sono stati analizzati e standardizzati reciprocamente come parte di un'unità. L'utilizzo di reagenti appartenenti a lotti diversi o preparati da altri fornitori può dare origine 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 può provocare risultati errati, per cui è vivamente sconsigliato.

I sieri devono essere testati ad una diluizione screening di 1:10 e di 1:40, a meno che i campioni vengano pretrattati per rimuovere le IgG eventualmente presenti, che possono interferire con il risultato (si consiglia l'uso di GullSORB™ reagente per l'inattivazione delle IgG, Codice n. XX715). Se il siero viene pretrattato con GullSORB deve essere analizzato solo alla diluizione 1:10. Altri metodi di pretrattamento dei sieri possono richiedere ulteriori diluizioni di screening.

PROCEDURA DEL TEST

1. Preparare la(e) diluizione(i) di screening con il tampone PBS oppure usare siero pretrattato.
2. Togliere il vetrino dalla busta sigillata.
3. Usando una pipetta Pasteur, distribuire una quantità di siero diluito (circa 15 µL) sufficiente a coprire la superficie del pozzetto di reazione.
4. Mettere il vetrino nella camera umida ed incubare a 37 °C per 90 minuti.
5. 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.
6. Lasciar asciugare il vetrino all'aria, mettendolo in posizione verticale su tovaglioli di carta assorbente.
7. Pulire gli spazi tra i pozzetti sul vetrino usando un tampone con il batuffolo di cotone inumidito con acqua distillata.
8. Usando una pipetta Pasteur, distribuire una quantità di Coniugato (circa 15 µL) sufficiente a coprire la superficie del pozzetto di reazione.
9. Incubare il vetrino a 37 °C in camera umida per 30 minuti.
10. Lavare ed asciugare il vetrino come descritto ai punti 5 e 6.
11. Appena prima di leggere, distribuire una quantità di Fluido di montaggio in modo che l'intera superficie di ciascun pozzetto ne risulti coperta quando viene messo il vetrino coprioggetto. Coprire il vetrino con un coprioggetto da 22 x 50 mm.
- NOTA:** L'aggiunta di una quantità eccessiva di Fluido di montaggio può causare movimenti eccessivi del vetrino coprioggetto. Una quantità insufficiente di Fluido di montaggio può rendere illeggibile una parte del substrato dei pozzetti.
12. 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. Una reazione positiva alla diluizione 1:10 o maggiore indica un'infezione acuta da EBV. Non è necessario procedere alla titolazione dei sieri risultati positivi al test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA. (vedere la Sezione "LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA" per interpretare le reazioni false positive causate dalla presenza di fattore reumatoide).

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(e) diluizione(i) screening indica l'assenza di livelli rilevabili di IgM anti-EBV.

CONTROLLO DI QUALITÀ

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

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

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

Il Controllo Positivo deve essere titolato per dare uno standard di riferimento per valutare la sensibilità del test. Esso dovrebbe mostrare una positività pari a 1+ in corrispondenza del titolo indicato sull'etichetta e dovrebbe mostare una forte reazione positiva alla diluizione 1:10. Una variazione da un giorno all'altro pari ad una/due diluizioni (sia in più che in meno) deve essere considerata accettabile. Una positività inferiore a 2+ alla diluizione 1:10 può indicare che qualcuno dei reagenti del kit non funziona secondo le specifiche.

Se i risultati del test non sono validi perché il Controllo Positivo o quello Negativo non danno i risultati attesi, 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 (in Italia +390331455646). I risultati del test non devono essere riferiti fino a quando le anomalie non vengono corrette.

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

VALORI ATTESI

Un risultato positivo alla diluizione screening di 1:10 (dopo aver eliminato le eventuali interferenze da RF) indica un'infezione acuta (primaria) da EBV. Le IgM anti-VCA di EBV vengono prodotte in tutte le forme primarie dell'infezione da EBV, sintomatiche o assintomatiche. Con il Test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA i titoli massimi nei pazienti con infezione da EBV diagnosticata vanno da 40 a 1280. Le IgM diminuiscono rapidamente, fino ad arrivare a livelli non rilevabili dopo 8-10 settimane.⁴

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

1. Le IgG immuni eventualmente presenti nel campione possono causare reazioni false negative poiché competono con le IgM specifiche anti-EBV per i siti di legame del substrato. Le IgG immuni possono anche dare risultati falsi positivi formando complessi immuni con l'antigene, che successivamente legano le IgM del fattore reumatoide (IgM-RF). I test di routine per RF possono non essere in grado di rilevare piccole quantità di IgM-RF, che però vengono messe in evidenza da test più sensibili, quali la tecnica IFA. Pertanto, un campione per la ricerca di IgM anti-EBV dovrebbe essere pretrattato (ad es., con il reagente GullSORB™, Codice n. XX715) per eliminare le IgG immuni e l'interferenza da RF.
2. Le IgM anti-cellula, se presenti nel siero, possono interferire con il Test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA. Tuttavia, questa interferenza viene facilmente individuata poiché la colorazione prodotta dagli anticorpi specifici anti-EBV coinvolge solo le cellule infettate da EBV (circa il 15%).
3. 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.
4. A causa della capacità innata dei linfociti HR1 di sintetizzare IgM in vitro, alcuni lotti di vetri possono mostrare una debole fluorescenza di fondo. Essa è caratterizzata da una distribuzione disomogenea di punti fluorescenti osservati all'interno della maggioranza delle cellule. Questo tipo di colorazione punteggiata viene facilmente distinta da quella dovuta alle IgM specifiche anti-EBV (relativamente uniforme e coinvolgente l'intera cellula) poiché il numero di cellule fluorescenti e la loro intensità non assomigliano a quelle date dal Controllo Positivo alla diluizione corrispondente al titolo.
5. I campioni di siero con titoli elevati di IgM anti-Cytomegalovirus e anti-Herpes Simplex possono dare reazioni non-specifiche alla diluizione 1:10.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Se eseguito seguendo le istruzioni, il Test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA è un metodo rapido e sensibile che consente di diagnosticare l'infezione da EBV. La sensibilità di ciascun lotto di prodotto è controllata mediante sieri di riferimento per assicurare che i risultati siano riproducibili. Studi clinici sul Test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA hanno dimostrato una sensibilità pari al 96% ed una specificità del 100% per la ricerca di IgM anti-VCA di EBV.⁵

I test per la ricerca di anticorpi eterofili e di IgG anti-EBV presentano limitazioni simili per quanto riguarda la diagnosi della fase acuta, poiché rilevano la presenza di anticorpi che sono prodotti in un secondo tempo e che persistono per periodi di tempo più prolungati. La persistenza di anticorpi può causare confusione in quei pazienti che successivamente con traggono infezioni causata da altri agenti, soprattutto se l'infezione originale da EBV non è stata diagnosticata.⁶ La ricerca delle IgM risolve il problema legato ai risultati falsi positivi del test per gli anticorpi eterofili e dei falsi negativi nei bambini.⁴ Poiché le IgG anti-VCA spesso sono ai livelli massimi quando il primo campione di siero viene prelevato, la diagnosi di MI mediante la rilevazione della sieroconversione o di un aumento degli anticorpi è assai improbabile. In genere, la diagnosi di un'infezione acuta è difficile se si determina il titolo di IgG su un solo campione, perché il limite superiore degli anticorpi persistenti spesso si sovrappone a quello inferiore dei livelli massimi rilevati in corso di MI acuta.⁷ Dato che le IgM sono presenti solo durante la fase acuta, il Test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA richiede un solo siero, i sieri positivi non devono essere titolati ed il risultato può essere semplicemente riferito in termini di presenza o assenza di IgM immuni.

EBV VCA IgM IFA

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

REF EB150

IVD

Rx Only

BUT DE LA METHODE

Le test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA utilise une méthode d'immunofluorescence sensible et rapide qui permet la détection qualitative des anticorps dirigés contre l'antigène de la capsid virale (VCA) du virus Epstein-Barr (EBV) dans le sérum humain. Le résultat du test procure une information importante pour le diagnostic d'une infection active à EBV.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Le virus d'Epstein-Barr est probablement le virus humain le plus commun et le plus largement disséminé. Pratiquement chaque individu acquiert, avec l'âge, des anticorps contre l'EBV.¹ Les réponses lors d'une infection primaire à EBV vont de l'infection clinique chez les enfants de moins de 2 ans, à la maladie grave et débilitante chez les jeunes adultes. La maladie symptomatique prédominante de l'infection à EBV est la mononucléose infectieuse (MI). Le déclenchement de la MI est insidieux, avec maux de tête, maux de gorge, fièvre, gonflement des ganglions lymphatiques cervicaux, splénomégalie, malaise et certaines formes de pharyngite. Le dysfonctionnement du foie est plus marqué pour la mononucléose à EBV que pour la mononucléose à CMV, et doit être considéré dans le diagnostic différentiel avec l'hépatite.² D'autres maladies induites par l'EBV peuvent atteindre les systèmes neurologique, cardiaque, oculaire, respiratoire, hématologique, digestif et rénal. Les syndromes neurologiques associés à l'infection à EBV comprennent la méningite, l'encéphalite, le syndrome de Guillain-Barré, la paralysie de Bell, la myélite, la névrite du nerf crânien et des désordres psychotiques. L'implication du bulbe et la paralysie respiratoire qui s'ensuit peuvent être fatales.³ L'EBV est également associé au lymphome de Burkitt et au carcinome nasopharyngien.¹

De nombreux antigènes viraux sont libérés tout au long de l'infection à EBV. Les antigènes de la capsid virale (VCA) apparaissent au tout début de l'infection, et sont toujours présents dans les cas d'infection à EBV. Comme les IgM dirigées contre l'antigène de la capsid de l'EBV sont les anticorps de phase aiguë, elles constituent l'antécédent de choix pour la détection de la maladie active. La sérologie constitue le seul moyen d'identifier une infection à EBV en l'absence de symptômes typiques permettant de diagnostiquer une MI. De même, la sérologie EBV est importante pour le diagnostic de l'infection chez les jeunes enfants dans la mesure où ceux-ci ne développent habituellement pas les symptômes typiques de la MI, ni d'anticorps hétérophiles.⁴

PRINCIPE DU TEST

Le test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA utilise la méthode d'immunofluorescence indirecte (IFI). On fait réagir le sérum du patient avec le substrat constitué de cellules lymphocytaires de Burkitt. Si des anticorps de type IgM dirigés contre l'antigène de la capsid virale de l'EBV sont présents dans le sérum du patient, ils se lient au substrat antigenique et ne sont pas éliminés lors du rinçage. Lorsqu'un anticorps anti-IgM humaine marqué à la fluorescéine est ajouté au site réactionnel, il se lie aux anticorps IgM, et provoque une fluorescence des cellules infectées par l'EBV qui peut être observée au microscope à fluorescence.

MATERIEL FOURNI

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

1. **Lames EBV (substrat antigénique):** Portant des cellules lymphocytaires de Burkitt HR1 fixées sur chaque puits. Environ 10 à 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 prêtées à l'emploi dès l'ouverture de l'emballage. Les lames, conservées à 2-8 °C, sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. Ne pas utiliser de lame si l'indicateur de l'agent dessicant (voir ligne au centre du sachet dessicant) a viré du bleu au rose.
2. **Tampon phosphate salin (poudre PBS):** Dissoudre dans 1 litre d'eau distillée. Le PBS réhydraté 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.
3. **Sérum de contrôle positif et négatif (Voir section ATTENTION point 4):** Lyophilisé. Chaque sérum de contrôle est à reconstituer avec 1 mL de PBS pour donner une dilution de travail au 1:10. Les sérum reconstitués sont stables 6 semaines à 2-8 °C ou 8 mois à ≤ -20 °C. Le contrôle positif est constitué de sérum humain contenant des anticorps IgM anti-EBV. Le titre est indiqué sur l'étiquette.
4. **Conjugué:** Lyophilisé. Anticorps anti-IgM humaine (chèvre) marqués à la fluorescéine, à reconstituer avec 2 mL de PBS. Le conjugué contient du contre-colorant et est prétraité pour l'utilisation avec chaque coffret. Le conjugué reconstitué peut être conservé 2 semaines à 2-8 °C ou être aliquoté et conservé 8 mois à ≤ -20 °C. Eviter de recongeler des aliquots dégelés.
5. **Liquide de montage:** Le liquide de montage, tamponné à pH 8,0, est une combinaison glycérol-eau formulée de façon à minimiser l'élation du contre-colorant. Il est prêt à l'emploi.

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

1. Matériel de laboratoire de sérologie: tubes à essai 12 x 75 mm, portoir, pipettes sérologiques et pipettes Pasteur.
2. Ballon jaugé de 1 litre.
3. Bouteille de lavage.
4. Eau distillée.
5. Bac de coloration.
6. Coton tiges, papier absorbant.
7. Chambre humide.
8. Lamelles couvre-objet, n° 1, 22 x 50 mm.
9. Etuve à 37 °C.
10. 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 condenseur 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

1. Le conjugué contient du bleu Evans comme contre-colorant. Ce colorant peut être cancérogène. Eviter le contact avec la peau.
2. 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'azides dans les tuyaux.
3. L'azide de sodium est très毒ique en cas d'ingestion. Au contact d'un acide, il dégage un gaz très毒ique. En cas de contact avec la peau, laver immédiatement et abondamment à l'eau.
4. 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

  PBS Powder	Mention d'avertissement Danger Mentions de danger H301 – Toxique en cas d'ingestion H310 – Mortel par contact cutané H411 – Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme Contient Sodium azide Conseils de prudence – UE (§28, 1272/2008) P301 + P310 – EN CAS D'INGESTION: appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin P321 – Traitement spécifique (voir .? sur cette étiquette) P280 – Porter un équipement de protection des yeux/du visage P361 – Enlever immédiatement les vêtements contaminés P322 – Mesures spécifiques (voir .? sur cette étiquette)
---	---

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

1. La date d'expiration est indiquée sur les étiquettes du coffret. Le coffret doit être conservé à 2-8 °C et remis au réfrigérateur après chaque usage.
2. Le coffret est prêt à l'emploi après reconstitution des réactifs.
3. Une fois reconstitués, le conjugué et les sérum doivent être conservés à ≤ -20 °C. Les congélateurs autodégivrant ne sont pas recommandés.
4. Les emballages des lames individuelles ne doivent pas être ouverts qu'au moment de leur utilisation.
5. Les réactifs et les lames d'antigène ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption.
6. Des températures et des temps d'incubation autres que ceux spécifiés peuvent donner des résultats erronés.
7. 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 congelé (-20 °C) si il n'est pas testé dans la semaine. Les congélateurs auto-dégivrant ne sont pas recommandés en tant qu'unités de stockage. L'utilisation de sérum hémolysé, lipémique ou présentant une croissance microbienne n'est pas recommandée.

Des dilutions de dépistage au 1:10 et de 1:40 sont recommandées pour le test, sauf si une procédure de prétraitement du sérum est utilisée pour éliminer les IgG interférentes (p.ex. Réactif d'inactivation des IgG GullSORB™, Réf. Catalogue: XX715). Dans le cas d'un prétraitement du sérum avec le GullSORB, seule la dilution résultante 1:10 doit être testée. D'autres méthodes de prétraitement du sérum peuvent nécessiter des dilutions de dépistage supplémentaires.

PROCEDURE DE TEST

1. Préparer une ou plusieurs dilution(s) de dépistage du sérum dans le PBS ou utiliser un sérum prétraité.
2. Retirer la lame de son emballage.
3. Ajouter, à l'aide d'une pipette Pasteur, suffisamment de sérum dilué (environ 15 µL) pour couvrir chaque site de réaction.
4. Placer la lame en chambre humide et incuber 90 minutes à 37 °C.
5. 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.
6. Laisser sécher la lame à l'air ambiant dans le placant verticalement sur du papier absorbant.
7. Essuyer entre les puits avec un coton tige humidifié à l'eau distillée.
8. Ajouter suffisamment de conjugué (environ 15 µL) pour couvrir chaque site de réaction.
9. Incuber la lame en chambre humide, 30 minutes à 37 °C.
10. Rincer et sécher la lame comme décrit aux points 5 et 6.
11. 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, no 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.
12. Lire la lame sans délai au grossissement 150-200X.

INTERPRETATION DES RESULTATS

La réaction est POSITIVE lorsque 10 à 20% des cellules d'un champ présentent une fluorescence jaune-vertâtre. Les autres cellules constituent un fond rouge contrastant. Une réaction positive à une dilution 1:10 ou plus indique une infection en cours par l'EBV. Il n'est pas nécessaire de titrer les sérums positifs dans le test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA. (Voir les LIMITES DU TEST pour exclure les faux positifs dus aux facteurs rhumatoïdes).

La réaction est NEGATIVE lorsque les cellules ne donnent pas de fluorescence jaune-vertâtre, mais présentent une coloration rouge due au contre-colorant ou une légère coloration spéifique, inférieure à une réaction +1, à la dilution de dépistage. Une réaction négative à la (aux) dilution(s) de dépistage indique une absence d'anticorps IgM anti-EBV détectables.

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 présenter une réaction 1+ au titre annoncé et augmenter jusqu'à une réaction fortement positive à la dilution 1:10. Une variation inter-série d'un facteur de dilution 2 de part et d'autre du titre annoncé est considérée comme acceptable. Une réaction inférieure à 2+ à la dilution 1:10 peut indiquer que le test ne remplit pas les spécifications. Si les contrôles ne donnent pas les résultats escomptés, les résultats du test doivent être considérés comme non valides.

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

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/IEC 15198)".

VALEURS ATTENDUES

Un résultat positif à la dilution de dépistage 1:10 (après avoir éliminé toute interférence des FR) indique une infection active (primaire) par l'EBV. Il y a production d'anticorps de type IgM dirigés contre la capsid de l'EBV dans tous les cas d'infections primaires à EBV, qu'elles soient symptomatiques ou asymptomatiques. Les patients chez lesquels une infection EBV est diagnostiquée présentent avec le test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA des titres maximaux (pics) d'IgM allant de 40 à 1280. Les anticorps IgM diminuent rapidement jusqu'à des taux non détectables en 8 à 10 semaines.⁴

LIMITES DU TEST

1. Les IgG immunes de l'échantillon à tester peuvent provoquer des faux négatifs par compétition avec les IgM spécifiques de l'EBV pour les sites de liaison au substrat. Les IgG immunes peuvent également provoquer des faux positifs en formant des complexes immuns avec le substrat antigénique qui peuvent alors se lier aux facteurs rhumatoïdes de classe IgM (FR-IgM). Les tests de routine des FR ne détectent pas toujours de petites quantités de FR-IgM, qui seront détectées par la technique IFI, plus sensible. De ce fait, les échantillons de sérum à tester en MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA devraient être prétraités (p.ex. Réactif GullSORB™, Réf. Catalogue: XX715) pour éliminer l'interférence des IgG immunes et des FR.
2. Lorsqu'ils sont présents dans le sérum, les anticorps IgM anti-cellules peuvent interférer avec le test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA. Cette interférence est toutefois facilement discernable, étant donné que la coloration produite par les anticorps spécifiques de l'EBV implique uniquement les cellules infectées par l'EBV (environ 15%).
3. Les titres finaux peuvent varier en fonction du type de microscope, de la source de lumière, de l'âge de l'ampoule ou du système de filtre utilisés pour lire les réactions.
4. Etant donné la capacité intrinsèque des lymphocytes HR1 à synthétiser des IgM in vitro, certains lots de lames présentent un léger bruit de fond de fluorescence. Cette coloration est constituée de points fluorescents distribués de façon irrégulière dans la majorité des cellules. Cette coloration en pointillé se distingue facilement de la fluorescence des anticorps immuns IgM anti-EBV, qui est relativement uniforme et implique toute la cellule. Dans le cas d'une coloration en pointillé, le nombre de cellules fluorescents et l'intensité de la fluorescence ne ressemblent pas à ceux du contrôle positif au titre indiqué.
5. Des échantillons de sérum présentant des titres élevés d'anticorps IgM dirigés contre le Cytomégalovirus et le virus Herpès simplex peuvent montrer une réaction non spécifique à la dilution 1:10.

PERFORMANCES DU TEST

Lorsqu'il est utilisé suivant les instructions, le test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA est une méthode de diagnostic des infections à EBV sensible et rapide. La sensibilité de chaque lot de coffrets est contrôlée en analysant des sérums de référence de façon à assurer la reproductibilité des résultats. Des études cliniques du test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA ont montré une sensibilité de 96% et une spécificité de 100% pour les anticorps IgM dirigés contre l'antigène de capsid de l'EBV.⁵

Les tests des anticorps hétérophiles et des anticorps IgG anti-EBV présentent des limites inhérentes au diagnostic rapide d'une maladie active, puisqu'ils mesurent des anticorps qui se développent plus lentement et persistent plus longtemps. Cette persistance des anticorps peut être une source de confusion chez des patients infectés ultérieurement par d'autres agents, en particulier dans les cas où l'infection originale par l'EBV n'a pas été diagnostiquée.⁶ Le test des IgM résout les cas de faux positifs des anticorps hétérophiles et les problèmes de faux négatifs chez les enfants.⁴ Etant donné que les titres d'IgG VCA sont fréquemment à leur maximum au moment du premier prélèvement de sérum, il est peu probable de diagnostiquer une MI par séroconversion ou par observation d'une augmentation du titre. De même, le diagnostic d'une maladie active par le titre d'IgG d'un seul échantillon de sérum est difficile, étant donné que l'intervalle supérieur des titres persistants observés en période de convalescence recouvre partiellement l'intervalle inférieur des titres maximaux obtenus en phase aiguë de MI.⁷ Etant donné que les IgM ne sont présentes que dans le cas d'une maladie active, le test MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA ne nécessite qu'un seul échantillon de sérum. Il n'est pas nécessaire de titrer les sérums positifs, et les résultats peuvent être simplement rapportés en termes de présence ou d'absence d'IgM immunes.



EBV VCA IgM IFA

Una prueba de inmunofluorescencia para detectar anticuerpos de tipo IgM contra el virus de Epstein Barr

REF EB150

IVD

Rx Only

USO INDICADO

La prueba de MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA es una prueba de inmunofluorescencia sensible y rápida para la detección cualitativa de anticuerpos contra los antígenos de cápside viral (ACV) del virus de Epstein-Barr (EBV) presente en suero humano. Este provee valor al dar información que soporta el diagnóstico de infección activa por EBV.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El virus de Epstein-Barr (EBV) es probablemente el virus humano más común y ampliamente diseminado. Prácticamente todo el mundo adquiere anticuerpos contra el EBV con el paso de los años.¹ La respuesta a la infección primaria por el EBV abarca desde infección subclínica en niños menores de dos años hasta enfermedad debilitante y severa en adultos jóvenes. La enfermedad sintomática predominante de la infección por el EBV es la mononucleosis infecciosa (MI). La MI tiene un comienzo caracterizado por dolor de cabeza, dolor de garganta, fiebre, agrandamiento de los ganglios linfáticos cervicales, esplenomegalia, malestar y un tipo de faringitis. La anomalía de la función hepática es más marcada en la mononucleosis por el EBV que en la mononucleosis por citomegalovirus (CMV), y ésta debe tenerse en cuenta en el diagnóstico diferencial de la hepatitis.² Otras enfermedades inducidas por el EBV pueden comprometer los sistemas neurológicos, cardíacos, oculares, respiratorios, hematológicos, digestivos y renales. Entre los síndromes neurológicos asociados con la infección por EBV se encuentran la meningitis, encefalitis, el síndrome de Guillain-Barré, la parálisis de Bell, la mielitis, la neuritis del nervio craneal y los desórdenes sicóticos. El compromiso bulbar se sigue de parálisis respiratoria puede ser fatal.³ El EBV también es asociado con el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaringeo.¹

Muchos抗igenos virales son liberados en el curso de la infección por el EBV. Los抗igenos del cápside viral (VCA) no sólo aparecen primero sino que se desarrollan en todos los casos de infección por el EBV. Ya que la IgM contra el抗igeno del cápside del EBV es el anticuerpo de fase aguda, ésta es la mejor opción para detectar los casos de enfermedad activa. Las pruebas serológicas son el único medio para identificar la infección por el EBV cuando no existen síntomas diagnósticos típicos de MI. Del mismo modo, la serología es importante en el diagnóstico de niños pequeños, ya que éstos por lo general no desarrollan síntomas típicos de MI o anticuerpos heterófilos.⁴

PRINCIPIOS BIOLOGICOS

El método de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es utilizado en el ensayo de MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA. En esta prueba, el suero del paciente es puesto a reaccionar con el substrato celular de linfocitos provenientes de un linfoma de Burkitt, y en caso de que anticuerpos contra el抗igeno de cápside viral del EBV se encuentren presentes, éstos se unirán al substrato antigenico y no serán eliminados. Posteriormente, cuando la IgM anti-humana conjugada con fluorescina es añadida en el lugar de reacción, ésta se unirá a los anticuerpos de tipo IgM, haciendo que las células infectadas con el EBV fluorescan cuando se observan 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 substrato EBV (EBV):** Con células HR1 provenientes de un linfoma de Burkitt, fijadas en cada uno de los pocillos. Aproximadamente 10-20% de las células fijadas expresan el抗igeno 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 se saquen de los sobres de papel aluminio. Los portaobjetos almacenados entre 2-8 °C son estables hasta la fecha descrita en la etiqueta. 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. Cuando el PBS es rehidratado, éste 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 de Control (Vea Advertencia Paso 4):** Liofilizados. Cada suero control humano es reconstituido con 1 mL de PBS, lográndose una concentración final de trabajo de 1:10. Los sueros reconstituidos son estables durante seis semanas a una temperatura entre 2-8 °C, o durante ocho meses a ≤ -20 °C. El Control Positivo está compuesto por suero humano el cual contiene anticuerpos de tipo IgM contra el EBV. El título está descrito en la etiqueta.
- Conjugado:** Liofilizado. Anticuerpo IgM anti-humano (cabra) marcado con Fluorescina, la cual debe reconstituirse con 2 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 puede ser alicuotado y almacenado hasta por ocho meses a ≤ -20 °C. Las alicuotas descongeladas no deberán volver a congelarse.
- Líquido de montaje:** De 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 No. 1 de 22 x 50 mm.
- Incubadora a 37 °C.
- Microscopio de fluorescencia. Un filtro de excitación de luz azul para FITC, y un filtro de barrera de 515 nm (o cualquier otro sistema de filtros comparables) es sugerido para microscopía de luz transmitida, usando un condensador de campo oscuro, y para microscopía de luz incidente utilizando un espejo dicróico de 500 nm.

PRECAUCIONES

Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.

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抗igenos 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

	Palabra de advertencia
  PBS Powder	Peligro
	Indicaciones de peligro
	H301 – Tóxico en caso de ingestión
	H310 – Mortal en contacto con la piel
	H411 – Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos
	contiene Sodium azide
	Consejos de prudencia – UE (§28, 1272/2008)
	P301 + P310 – EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico
	P321 – Se necesita un tratamiento específico (vér. ? en esta etiqueta)
	P280 – Llevar gafas/ máscara de protección
	P361 – Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas
	P322 – Se necesitan medidas específicas (vér. ? en esta etiqueta)

VIVO UTIL Y ALMACENAMIENTO

- La fecha de caducidad está indicada en la etiqueta del kit. Almacenar el kit a 2-8 C y colocarlo de nuevo en el refrigerador inmediatamente después de cada utilización.
- 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 sobres individuales de portaobjetos deberán mantenerse sellados hasta el momento mismo antes de usarse.
- Tanto los reactivos como los portaobjetos con antígeno no deberán usarse después de la fecha de caducidad descrita.
- Los tiempos de incubación y las temperaturas diferentes a aquéllos especificados pueden dar resultados erróneos.
- Los componentes de este kit han sido evaluados y estandarizados como una unidad. El uso de componentes pertenecientes a otros lotes, o a otros fabricantes, puede producir resultados insatisfactorios.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de sangre obtenidas por venipunción 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. No se recomienda uso de sueros que muestran hemólisis, lipemia o contaminación microbiana.

El suero deberá ser analizado a una dilución de 1:10 y de 1:40, a menos que éste haya sido pre-tratado en un procedimiento para la eliminación de IgG, la cual puede causar interferencia (por ejemplo con reactivo de inactivación de IgG GullSORB™, Producto Número XX715). Si el suero es pre-tratado con GullSORB, solamente la dilución 1:10 deberá ser analizada. Métodos diferentes para pre-tratar los sueros es posible que requieran diluciones adicionales sean examinadas.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Prepare las diluciones a examinar del suero del paciente utilizando PBS, o el suero pre-tratado.
- Saque el portaobjetos del sobre de papel aluminio.
- Utilizando una pipeta Pasteur, añada la cantidad suficiente de suero diluido (aproximadamente 15 µL) para recubrir cada pocillo.
- Coloque el portaobjetos en una cámara húmeda e incube a 37 C durante 90 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, colocándolo de lado sobre una toalla absorbente.
- Con un hisopo de algodón humedecido con agua destilada seque los espacios entre los pocillos de reactividad.
- Añada solamente la cantidad necesaria de conjugado para recubrir cada pocillo (15 µL).
- Incube el portaobjetos a 37 C 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 substrato quede cubierto cuando el cubreobjetos sea colocado. Cubra con un cubreobjetos No.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 substrato sea imposible de leer.

- Lea el portaobjetos tan pronto como le 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. Una reacción positiva a una dilución igual a 1:10 o mayor es indicativa de infección activa por el EBV. No es necesario titular los sueros positivos en el ensayo de MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA. (Véase LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO para eliminar la posibilidad de falsos positivos a causa del factor reumatoideo).

La reacción se considera NEGATIVA cuando las células no fluorescen de color amarillo-verdoso sino que aparecen de color rojo debido al colorante de contraste o exhiben menos de 1+ de reacción en la dilución de tamizaje. Una reacción negativa a la dilución inicial en que se hizo el ensayo indica la ausencia de anticuerpos detectables de tipo IgM 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 analizarse cada vez que el ensayo sea realizado.

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

El Suero Control Positivo deberá ser titulado para proporcionar un estándar que chequee la sensibilidad del ensayo. Éste deberá exhibir una reacción positiva igual a una cruz: 1+ cuando se prueba diluido al título especificado, y aumentar a una reacción positiva fuerte cuando se prueba a una dilución 1:10. Una variabilidad día a día de una dilución doble que puede ser mayor o menor que el título especificado se considera funcionamiento aceptable. Una reacción menor a dos cruces 2+ a la dilución 1:10 puede indicar que el ensayo no está funcionando dentro del límite de las especificaciones.

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, 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. Los resultados del ensayo no deberán ser reportados en tanto que la condición o condiciones no sean corregidas.

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

Una reacción positiva a la dilución de 1:10 en que se hizo el ensayo (después de excluir la interferencia posible por el FR) es indicativa de infección activa primaria por el EBV. La IgM contra el cápside del EBV es producida en todas las infecciones primarias (sintomáticas o asintomáticas) causadas por el EBV. Los títulos de IgM en pacientes con infección por el EBV diagnosticada, tienen un rango mínimo de 40, y uno máximo de 1280 en el ensayo de MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA. Los anticuerpos de tipo IgM disminuyen rápidamente a niveles no detectables en un periodo de ocho a diez semanas.⁴

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los anticuerpos inmunes de tipo IgG en la muestra examinada, pueden causar resultados negativos falsos al competir con la IgM específica contra el EBV por el lugar de reacción con el substrato. Además, la inmunoglobulina G inmune también puede causar falsos positivos al formar complejos inmunes con el substrato antigenico, el cual luego puede unirse al factor reumatoideo de clase IgM (IgM-FR). Las pruebas de rutina para la detección del FR es posible que no detecten pequeñas cantidades de IgM-FR, las cuales si son reconocidas por la técnica de IF, pues ésta posee mayor sensibilidad. Por lo tanto, las muestras de sueros que van a ser examinadas por MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA deberán ser pre-tratadas (por ejemplo con el reactivo GullSORB™, Producto Número XX715) con reactivos que eliminan las interacciones causadas por la IgM inmune y el FR.
- Los anticuerpos anticelulares de tipo IgM (en caso de estar presentes en el suero) es posible que interfieran con el ensayo de MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA. Sin embargo, esta interferencia es fácilmente discernible, ya que el patrón de tinción producido por los anticuerpos específicos contra el EBV involucra solamente las células infectadas con el EBV (aproximadamente el 15% de las mismas).
- Los títulos finales pueden variar dependiendo del tipo de microscopio usado, de la fuente de luz, del tiempo de uso de la lámpara y del sistema de filtros usados para leer las reacciones.
- Debido a la capacidad innata de los linfocitos para sintetizar IgM *in vitro*, algunos lotes de portaobjetos exhibirán una fluorescencia débil en el fondo. Esta tinción consiste en puntos fluorescentes dispersados de forma irregular dentro de la mayoría de las células. Cuando esta tinción punteada aparece, es fácilmente distinguible de la fluorescencia relativamente uniforme y que abarca la totalidad de la célula producida por la IgM inmune contra el EBV. Además, el número de células fluorescentes y la intensidad de la fluorescencia no se asemeja a la producida por el control positivo al título especificado anteriormente.
- Las muestras de suero con títulos altos de IgM contra el citomegalovirus y el virus del herpes simplex pueden presentar una reacción no-específica en la dilución de 1:10.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Cuando el ensayo de MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA es realizado de acuerdo con las instrucciones aquí descritas, éste es un método sensible y rápido para diagnosticar la infección por el EBV. La sensibilidad de cada lote del kit es controlada haciendo pruebas con sueros de referencia para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Los estudios clínicos del ensayo de MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA demostraron una sensibilidad de 96% y una especificidad de 100% para anticuerpos de tipo IgM contra el antígeno del cápside del EBV.⁵

Las pruebas para anticuerpos heterófilos y anticuerpos de tipo IgG contra el EBV tienen limitaciones inherentes en el diagnóstico rápido de enfermedad activa, ya que éstas miden anticuerpos que se desarrollan más despacio y persisten durante períodos más largos de tiempo. La persistencia de estos anticuerpos puede crear confusión en aquellos pacientes infectados más tarde con otros agentes, especialmente cuando la infección original por el EBV no fue diagnosticada.⁶ El ensayo para IgM resuelve los resultados positivos falsos en las pruebas para anticuerpos heterófilos, y el problema de los falsos negativos en los niños.⁴ Puesto que los títulos de IgG contra el VCA se encuentran en niveles máximos en el momento en que la primera muestra de suero es obtenida, el diagnóstico de la MI por seroconversión o por demostración de un incremento en el título es muy raro. De la misma manera, el diagnóstico de enfermedad activa por medio del título de IgG en una muestra aislada de suero es difícil, ya que el rango superior de los títulos convalecientes persistentes coincide con el rango inferior de los títulos más altos obtenidos en la fase aguda de la MI.⁷ Ya que la IgM solo se encuentra en casos de enfermedad presente, el ensayo de MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA tan sólo requiere una muestra aislada de suero, y los sueros positivos no se necesita que sean titulados. Además, éstos resultados pueden ser reportados simplemente en términos de la presencia o ausencia de IgM inmune.

EBV VCA IgM IFA

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

REF EB150

IVD

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Der MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Test ist eine sensitive und schnelle Immunfluoreszenz-Methode für den qualitativen Nachweis von Antikörpern gegen das Virale Capsid Antigen (VCA) des Epstein-Barr-Virus (EBV) in Humanserum. Er ist hervorragend geeignet, um unterstützende Informationen für die Diagnose von einer aktiven Infektion mit EBV zu erhalten.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Das Epstein-Barr Virus (EBV) ist wahrscheinlich das häufigste und am weitesten verbreitete menschliche Virus. So gut wie jeder Mensch entwickelt Antikörper gegen EBV mit fortschreitendem Alter.¹ Immunantworten auf eine primäre EBV-Infektion reichen von subklinischen Infektionen bei Kindern unter 2 Jahren bis zu schwer verlaufenden Erkrankungen junger Erwachsener. Die vorherrschende symptomatische Erkrankung einer EBV-Infektion ist die infektiöse Mononukleose (IM). Die IM bricht schlechend aus mit Kopf- und Halsbeschwerden, Fieber, vergrößerten zervikalen Lymphknoten, Splenomegalie, Unbehagen und einigen Formen der Pharyngitis. Eine EBV-Mononukleose ist eher durch eine abnormale Leberfunktion gekennzeichnet als eine CMV-assoziierte Mononukleose und muss bei der Differentialdiagnose einer Hepatitis mit berücksichtigt werden.² Andere EBV-induzierte Erkrankungen können Nerven und Herz, Augen, Atemweg, Blut, Verdauungstrakt und die Nieren betreffen. Neurologische Symptome, die mit einer EBV-Infektion assoziiert sind, beinhalten Meningitis, Enzephalitis, Guillain-Barré Syndrom, Bell's Palsie, Myelitis, Neuropathie der kranialen Nerven und psychotische Störungen. Eine bulbäre Beteiligung mit daraus resultierender respiratorischer Lähmung kann tödlich verlaufen.³ EBV assoziiert sind auch das Burkitt-Lymphom und das Nasopharynxkarzinom.¹

Viele virale Antigene werden bei einer EBV-Infektion exprimiert. Das virale Capsid Antigen (VCA) ist nicht nur zuerst nachzuweisen, sondern wird auch bei allen EBV-Infektionen entwickelt. Da IgM-Antikörper gegen das EBV-Capsid-Antigen in der akuten Phase produziert werden, ist dieser Antikörper der Antikörper der Wahl für den Nachweis einer akuten Erkrankung. Die Serologie ist das einzige Mittel, eine EBV-Infektion bei Abwesenheit der typischen diagnostischen Symptome einer IM, zu identifizieren. Ebenso ist die EBV-Serologie wichtig, um eine EBV-Infektion bei jungen Kindern zu diagnostizieren, die normalerweise keine typischen IM-Symptome aufweisen oder keine heterophilien Antikörper bilden.⁴

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

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

REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

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

- EBV antigenbeschränkte Objekträger:** 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 Objekträger sind durch den PsoralSafe™ Prozess nicht infektiös. Nach Entfernen der Verpackung sind die Objekträger gebrauchsfertig. Ungeöffnete Objekträgerpackungen sind bei Lagerung von 2-8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Verwenden Sie keine Objekträger, 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 ist 0,01 M, hat einen pH-Wert von 7,5 und 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. Fluoreszein-markiertes Anti-human-IgM (Ziege), das mit 2 mL PBS rekonstituiert wird. Es ist vortriert und enthält Evans Blau zur Gegenfärbung. Rekonstituierter Konjugat ist 2 Wochen bei 2-8 °C oder 8 Monate bei ≤ -20 °C haltbar. Aufgetaut Aliquots sollten nicht mehr eingefroren werden.
- Konjugat:** Lyophilisiert. Fluoreszein-markiertes Anti-human-IgM (Ziege), das mit 2 mL PBS rekonstituiert wird. Es ist vortriert und enthält Evans Blau zur Gegenfärbung. Rekonstituierter Konjugat ist 2 Wochen bei 2-8 °C oder aliquotiert und bei ≤ -20 °C gelagert 8 Monate haltbar. Aufgetaut 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, 1 Liter
- Waschflasche
- Destilliertes Wasser
- Färbekuvette
- Wattestäbchen, saugfähige Tücher
- Feuchte Kammer
- Deckgläser, Nr. 1, 22 x 50 mm
- Inkubator, 37 °C
- Fluoreszenzmikroskop, FITC Blaulichtfiltersystem Sperrfilter (515 nm) oder ein vergleichbares Filtersystem zur Bestimmung des Fluoreszeins wird ebenso für die Durchlichtmikroskopie mit Dunkelfeldkondensor als auch für die Auflichtmikroskopie bei Verwendung eines dichromatischen Spiegels (500 nm) empfohlen.

VORSICHTSMAßNAHMEN

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

VORSICHT

- 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 sich als nicht reaktiv auf Antigene oder Antikörper gegen die folgenden Viren: Humane Immundefizienz-Viren (HIV-1, HIV-2), Hepatitis-B-Virus, Hepatitis-C-Virus, so wie 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.

GEFÄHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

	Signalwort Gefahr Gefahrenhinweise H301 – Giftig bei Verschlucken H310 – Lebensgefahr bei Hautkontakt H411 – Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung Enthält Sodium azide Sicherheitshinweise – EU (§28, 1272/2008) P301 + P310 – BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen P321 – Besondere Behandlung (siehe „. auf diesem Kennzeichnungsetikett) P280 – Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen P361 – Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen P322 – Gezielte Maßnahmen (siehe „. auf diesem Kennzeichnungsetikett)
  PBS Powder	

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

- Das Haltbarkeitsdatum ist auf dem Testkitetikett angegeben. Lagern Sie den Kit bei 2-8 °C und legen Sie ihn sofort nach jedem Gebrauch in den Kühlschrank zurück.
- 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 Objekträger erst kurz vor Gebrauch aus der Verpackung nehmen.
- Reagenzien und Objekträger dürfen nach dem aufgedruckten Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden.
- Abweichende Inkubationszeiten und -temperaturen können fehlerhafte Resultate verursachen.
- Die Komponenten dieses Kits wurden als Einheit geprüft und standardisiert. Die Verwendung von Bestandteilen anderer Chargen oder Herstellern kann zu unbefriedigenden Resultaten führen.

PROBENAHME 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. Hämolysische, lipämische oder mit Mikroorganismen kontaminierte Seren sollen nicht verwendet werden.

1:10 und 1:40 Screeningverdünnungen werden für den Test empfohlen, es sei denn, eine Vorbehandlung der Seren wurde angewandt, um störende IgG zu entfernen (IgG Absorptionsreagenz, Art. Nr.: XX715). Wird das Serum mit dem IgG-Absorptionsreagenz vorbehandelt, so reicht eine 1:10 Verdünnung aus. Andere Methoden der Serumvorbehandlung können zusätzliche Screeningverdünnungen notwendig machen.

TESTDURCHFÜHRUNG

1. Screeningverdünnungen der Patientenserien mit PBS vorbereiten oder das vorbehandelte Patientenserum einsetzen.
2. Objekträger aus der Folie herausnehmen.
3. Mit Hilfe einer Pasteurpipette verdünnte Seren (ca. 15 µL) auf die Antigenfelder auftragen, so daß die gesamten Auftragsfelde r gerade ausreichend bedeckt sind.
4. Objekträger in die feuchte Kammer legen, 90 min. bei 37 C inkubieren.
5. Objekträger kurz mit PBS abspülen (den Strahl nicht direkt auf die Auftragsstelle richten), anschließend Objekträger 5 min. in PBS stellen.
6. Objekträger auf ein absorbierendes Tuch stellen und lufttrocknen lassen.
7. Den Raum zwischen den Auftragsstellen mit einem mit destilliertem Wasser getränkten Wattestäbchen trocknen.
8. Ca. 15 µL Konjugat auf die Antigenfelder auftragen.
9. Objekträger in der feuchten Kammer 30 min bei 37 C inkubieren.
10. Objekträger kurz mit PBS abspülen und wie unter Punkt 5 und 6 beschrieben trocknen.
11. Kurz vor dem Ablesen genügend Eideckmittel auf jedes Feld geben, damit beim Auflegen des Deckgläschens die Antigenfelder vollständig abgedeckt wird. Mit einem 22 x 50 mm großen, Nr. 1 Deckgläschchen abdecken.
Achtung: Zugabe von überschüssigem Eideckmittel kann ein verstärktes Bewegen des Deckgläschens verursachen. Zu wenig Eideckmittel kann zur Unlesbarkeit von Teilen der Antigenfelder führen.
12. Ergebnisse so bald wie möglich bei einer 150-200fachen Vergrößerung auswerten.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Das Ergebnis ist positiv, wenn die infizierten Zellen in jedem Feld (ca. 10-20% der Zellen) eine deutliche grünliche Fluoreszenz zeigen. Die restlichen Zellen erscheinen als roter Hintergrund. Eine positive Reaktion bei einer 1:10 Verdünnung oder größer deutet auf eine akute EBV-Infektion hin.

Es ist nicht notwendig, im MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Test die positiven Seren auszutitrieren (siehe unter: EINSCHRÄNKUNGEN: falsch positive Ergebnisse durch Rheumafaktoren). Ein negatives Ergebnis liegt vor, wenn die Zellen keine grünliche 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 Screeningverdünnung deutet auf keine nachweisbaren IgM Antikörper gegen EBV hin.

QUALITÄTSKONTROLLE

Führen Sie den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durch.

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 austitrieren, um einen Standard für die Testsensitivität zu erhalten. Die Positivkontrolle sollte bei dem auf dem Etikett aufgedruckten Titer eine 1+ Reaktion zeigen und bei der Screening-Verdünnung stark positiv reagieren. Abweichungen um eine Titerstufe in beide Richtungen liegen innerhalb der Toleranzgrenze. Eine Reaktion von weniger als 2+ bei der 1:10 Verdünnung deutet darauf hin, daß der Test nicht innerhalb seiner Spezifikation reagiert. Zeigen die Kontrollen nicht die erwarteten Resultate, ist der Testdurchlauf ungültig.

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

Ein positives Resultat bei einer 1:10 Screeningverdünnung (nach Absorption der Rheumafaktoren) deutet auf eine akute (primäre) EBV-Infektion hin. IgM-Antikörper gegen das EBV-Capsid-Antigen werden bei allen primären EBV-Infektionen, ob sie symptomatisch oder asymptomatisch verlaufen, gebildet. Die IgM-Titer bei Patienten mit einer diagnostizierten EBV-Infektion decken einen Titerbereich von 1:40 bis zu 1280 innerhalb des MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Tests ab. Die IgM-Antikörper fallen schnell ab und erreichen nicht mehr nachweisbare Titer in ca. 8-10 Wochen.⁴

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Immunglobulin G in den Proben kann zu falschen negativen Ergebnissen führen, wenn sie mit den EBV-spezifischen IgM um die Antigenbindungsstellen konkurrieren. Immunes IgG kann auch falsch positive Ergebnisse verursachen, wenn Immunkomplexe mit dem Antigensubstrat gebildet werden, die dann Rheumafaktoren der IgM-Klasse binden (IgM-RF). Routinemäßig eingesetzte RF-Tests können geringe Mengen an RF nicht nachweisen, die jedoch mit sensitiverem -Immunfluoreszenztest entdeckt werden können. Deshalb sollten die Proben, die im MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Test eingesetzt werden, vorbehandelt werden, um eine Beeinflussung durch immunes IgG und Rheumafaktoren zu verhindern.
2. Sind IgM-Anti-Zell-Antikörper im Serum vorhanden, können diese ebenfalls den MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Test beeinflussen. Jedoch ist diese Störung leicht zu erkennen, da die Färbung, die durch die Anwesenheit der EBV-IgM-Antikörper verursacht wird, nur die ca. 15% mit EBV infizierten Zellen betrifft.
3. Endpunktfilter können aufgrund des verwendeten Mikroskoptyps, der Lichtquelle, Alter der Lichtquellen und des eingesetzten Filtersystems variieren.
4. Aufgrund der eigenen Fähigkeit der HR1-Lymphozyten *in vitro* IgM-Antikörper zu synthetisieren, können einige Chargen der Objekträger einen schwachen fluoreszierenden Hintergrund verursachen. Die Fluoreszenz besteht aus unregelmäßig verteilten fluoreszierenden Flecken, die bei fast allen Zellen zu beobachten ist. Diese getupfte Färbung ist, wenn sie auftritt, leicht von der relativ einheitlichen, über die gesamte Zelle ausgedehnten Fluoreszenz (verursacht durch die VCA-IgM-Antikörper), zu unterscheiden.
5. Serumproben mit hohen IgM-Antikörpertitern gegen Cytomegalie-Viren und Herpes-Simplex-Viren können eine nicht spezifische Reaktion bei der 1:10 Verdünnung verursachen.

LEISTUNGSMERkmale

Bei vorschriftsmäßiger Durchführung stellt der MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Test ein sensitives und schnelles Verfahren für den Nachweis von Antikörpern gegen EBV dar. Die Sensitivität jeder Charge wird mit Referenzserien getestet, um reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten. Klinische Studien des MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Tests zeigen eine Sensitivität von 96% und eine Spezifität von 100% für den Nachweis von IgM-Antikörpern gegen das EBV-Capsid-Antigen.⁵

Tests für den Nachweis heterophiler Antikörper und der Nachweis für IgG-Antikörper gegen EBV haben Grenzen bei der schnellen Diagnose einer akuten Erkrankung, da Antikörper gemessen werden, die sich langsamer entwickeln und über längere Zeiträume persistieren. Diese Antikörperfürsisterien kann die Diagnostik bei Patienten erschweren, die später mit anderen Erregern infiziert wurden, speziell wenn die ursprüngliche EBV-Infektion nicht diagnostiziert wurde.⁶ Das Testen auf IgM-Antikörper löst das Problem falsch positiver und falsch negativer Ergebnisse beim Nachweis heterophiler Antikörper bei Kindern.⁴ Da VCA-IgG-Titer oft ihren Höchsttiters zu dem Zeitpunkt der ersten Probenentnahme bereits erreicht haben, wird die Diagnose einer IM durch Serokonversion oder dem Nachweis eines Titeranstiegs erschwert. Auch ist die Diagnose einer akuten Erkrankung durch Bestimmung des IgG-Titers eines einzigen Serums schwierig, da die IgG-Titer bei einer persistierenden kongenitalen Infektion höher liegen als die Titer während der akuten Phase einer IM und damit überdeckt werden.⁷ Da IgM-Antikörper nur während der akuten Erkrankung nachweisbar sind, wird für den MERIFLUOR EBV VCA IgM IFA Test nur eine einzige Serumprobe benötigt. Positive Seren müssen nicht austitriert werden, und die Resultate können als positiv oder negativ für immunes IgM eingestuft werden.

REFERENCES

1. Henle, W. and Henle, G. Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis, *Human Herpesvirus Infections*. Glaser and Gotlieb-Stematsky, ed. Marcel Dekker, Inc. New York. Basel. 1982.
2. Horwitz, C.A., et al. Heterophil-Negative Infectious Mononucleosis and Mononucleosis-Like Illnesses. Am. J. Med. 1977;63: 947-957.
3. Gotlieb-Stematsky, T. and Glaser, R. Association of Epstein-Barr Virus with Neurologic Diseases. *Human Herpesvirus Infections*. Glaser and Gotlieb-Stematsky, ed. Marcel Dekker, Inc. New York. Basel. 1982.
4. Nikoskelainen, J. and Hanninen, P. Antibody Response to Epstein-Barr Virus in Infectious Mononucleosis. Infect. Immun. 1975;11: 42-51.
5. Swenson, P.D., Clogston, A.G. and Fung, J.C. Detection of Immunoglobulin M Antibodies to Epstein-Barr Virus Capsid Antigen. Abstract of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology. (New Orleans, Louisiana, 1983), p. 330.
6. Nikoskelainen, J., Klemola, E., and Leikola, J. Epstein-Barr Virus-IgM Antibody Test in Infectious Mononucleosis. J. Infect. Dis. 1976;134: 313-314.
7. Henle, W., Henle, G. and Horwitz, C.A. Epstein-Barr Virus Specific Diagnostic Tests in Infectious Mononucleosis. Human Path. 1974;5: 551-565..



SN11742

REV. 09/20



Manufactured By

Meridian Bioscience, Inc.
Corporate Office
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244 USA
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

EC REP

Authorized Representative

Meridian Bioscience Europe S. r. L
Via dell' Industria, 7
20035 Villa Cortese, Milano
ITALY
Tel: +39 0331 43 36 36
Fax: +39 0331 43 36 16
Email: info@meridianbioscience.eu
WEB: www.meridianbioscience.com/eu

Meridian Bioscience Europe s.a./n.v.
2 Avenue du Japon - 1420 Braine l'Alleud
BELGIUM
Tel: +32 (0) 67 89 59 59
Fax: +32 (0) 67 89 59 58
Email: info.bn1@meridianbioscience.eu

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

Meridian Bioscience Europe b.v.
Postbus 301 - 5460 AH Veghel
NETHERLANDS
Tel: +31 (0) 411 62 11 66
Fax: +31 (0) 411 62 48 41
Email: info.bn1@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 simblos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositivo medical de diagnóstico in vitro / Dispositivo medico para diagnostico in vitro / In-Vitro-Diagnosiskum	EC REP	Authorized representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandatario 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 sur les 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 Diagnostica 98/79/EG.	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon / Borsa, diluente inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenverarbeitung, in dem sich Probenverdünnschlüsse befindet
	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht eingefrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabbricante / 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 zur IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" tests / Contiene suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limite di temperatura / Limites de température / Límite de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Conjugato enzimatico / Conjugé enzymatique / Conjugado enzimático / enzymkonzjugat
	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / testgarät	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzen
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
	Buffer / Soluzione tamponi / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
	Conjugate / Conjugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentrate / Soluzione diluente di lavaggio / Solution de lavage concentrée 20X / Solución de tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig	DET REAG	Detection Reagent / Reagente Directo / Réactif de Détection / Reactivo de Deteción / Nachweis Reagens
	Do not use if package is damaged / Non utilizzare se la confezione è danneggiata / ne pas utiliser si le paquet est endommagé / No use si el paquete está dañado / Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist	TUBE	Empty Tube / Provetta vuota / Tube vide / Tubo vacío / Leeres Gefäß

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.