

MERIFLUOR[®]

EBV-NA

Immunofluorescence assay for antibodies to EBV-NA

REF EN100

IVD

In vitro diagnostic medical device

R. Only

INTENDED USE

The MERIFLUOR EBV-NA Test is a rapid, sensitive anti-complement immunofluorescence (ACIF) test for the qualitative or quantitative detection of antibodies to the nuclear antigen of Epstein-Barr virus in human serum. The test can provide valuable diagnostic information to facilitate patient management when used in conjunction with other EBV antibody tests.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Epstein-Barr virus (EBV) is a widely-disseminated human pathogen which commonly causes infection in early childhood, resulting in asymptomatic or mild disease. However, individuals who contract infection with EBV in early adult life frequently develop classic infectious mononucleosis with symptoms of fever, pharyngitis, and cervical lymphadenopathy. Splenomegaly occurs in 50% of cases.¹ A variety of factors, in particular the immune competence of the individual, determine the clinical and pathologic expression of the disease. EBV infections can result in complications involving the neurologic, cardiac, ocular, respiratory, hematologic, digestive and renal systems.² Reactivation of latent infection has also been implicated in a persistent illness referred to in recent literature as the EBV-Associated Fatigue Syndrome.³

Infection with EBV results in the expression of multiple antigens with corresponding antibody responses. Of these, viral capsid antigen (VCA), early antigen (EA), and nuclear antigen (NA) are most useful diagnostically. At the onset of primary infection with EBV, VCA, IgG, VCA IgM, and EA antibody levels are elevated. Anti-NA levels begin to rise several weeks or months thereafter and remain at measurable titers, normally 1:10-1:160, indefinitely due to the persistent viral carrier state established following primary EBV infection. The lack of anti-NA (or very low levels of anti-NA) in the presence of IgG, IgM, and anti-EA antibodies is useful in establishing the presence of an acute primary infection.^{4,5}

Patients suffering from Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma have been shown to exhibit high levels of anti-NA antibodies.^{6,7} Conversely, anti-NA antibodies may be absent in immunosuppressed patients or those with severe immunologic defects.⁴

Indirect immunofluorescence (IFA) is the method most commonly used to test for EBV-specific antibodies. Testing for antibodies to EBV-NA requires greater sensitivity, and the ACIF technique is an easily-visualized means of determining anti-NA titers in human serum.⁸

BIOLOGICAL PRINCIPLES

The anti-complement immunofluorescence (ACIF) procedure is used in the MERIFLUOR EBV-NA Test. Patient serum is reacted with EBV-NA substrate and if antibodies to NA of EBV are present, they will bind to the substrate and not rinse off. Guinea pig complement (C') is then added and is bound by the antigen-antibody complex. Subsequently, when fluorescein-conjugated antibody to guinea pig C3 is added to the reaction site, it will bind to the C3 component of complement, causing the EBV-infected cells to have a granular pattern of nuclear fluorescence when viewed through a fluorescence microscope.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

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

- EBV-NA Substrate Slides:** Each with EBV-NA positive and negative cells fixed onto each well. Approximately 20-40% of the cells in each well are a Burkitt's lymphoma (Raji) cell line which is EBV-NA positive but cannot produce infectious EBV virions. The remaining cells do not express NA and are present to permit easy reading and optimal contrast with the positive cells. 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.
- Guinea Pig Complement (C'):** Lyophilized. Each vial sufficient for approximately 100 tests. Upon initial use, rehydrate one vial of C' with 1 mL of cold (2-8 C) sterile distilled water and divide into 100 µL aliquots. The aliquots should be tightly capped and immediately frozen at ≤ -20 C. Reconstituted C' is stable for 6 weeks at ≤ -20 C. Thawed aliquots should not be refrozen and reused.
- Complement Diluent:** Contains PBS with at least 0.01% each Ca++ and Mg++. Store at 2-8 C.
- Anti-Guinea Pig C3 (fluorescein-labeled):** Lyophilized, (goat). Reconstitute with 3 mL of PBS. This conjugate contains less than 0.1% Evans blue counterstain and is pretiered for use with each kit. The reconstituted conjugate can be stored for up to 2 weeks at 2-8 C or can be divided into aliquots and stored for up to 8 months at ≤ -20 C. Thawed aliquots should not be refrozen.
- Phosphate Buffered Saline (PBS) Powder:** Rehydrate to 1 liter with distilled water. The rehydrated solution is a 0.01 M phosphate buffer at pH 7.5 and contains sodium azide. Rehydrated PBS stored at 2-8 C is stable indefinitely.
- Positive and Negative Control Sera (See Warnings Step 4):** Heat inactivated and lyophilized. Each human control serum is reconstituted with 1 mL PBS to give a 1:10 working dilution. The titer is stated on the label of the Positive Control. The reconstituted sera are stable for 6 weeks at 2-8 C or for 8 months at ≤ -20 C. Thawed aliquots should not be refrozen. The control sera have been heat inactivated at 56 C for 30 minutes and should not be reheated before use.
- 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
- Ice bath
- Distilled water
- Sterile distilled water
- Staining dish
- Disposable tubes with tight-fitting caps
- Moist chamber
- Cover slips, No. 1, 22 x 50 mm
- 37 C Incubator
- 56 C heat bath
- Fluorescence microscope. A FITC blue light excitation filter and a 515 nm barrier filter, or any comparable filter system is suggested for transmitted-light microscopy using a darkfield condenser and for incident-light microscopy using a 500 nm dichroic mirror.

PRECAUTIONS

All reagents are for in vitro diagnostic use only.

WARNINGS

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

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

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

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

SHELF LIFE AND STORAGE

- Upon receipt of the kit, the two vials of complement should be detached and stored at ≤ -20 C. The remaining kit components should be stored in the refrigerator (2-8 C).
- The kit is ready for use after reconstitution of reagents.
- Individual slide packets should remain sealed until just before use.
- Reagents and antigen slides should not be used beyond stated expiration dates.
- If lyophilized reagents show evidence of rehydration, they should not be used.
- Self-defrosting freezers are not recommended for storage of complement, conjugate or control sera.
- The components of this kit have been tested and standardized as a unit. Use of components from other lots or other manufacturers may yield unsatisfactory results.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

Before testing, an aliquot of the serum sample must be heated for 30 minutes at 56 C to inactivate endogenous complement.

For qualitative results, sera should be screened at a 1:10 dilution. For quantitative results, sera can be titrated using serial two-fold dilutions. All serum dilutions should be prepared with PBS.

TEST PROCEDURE

- Prepare dilution(s) of heat-inactivated patient serum with PBS.
- Remove slide from foil packet.
- Using a Pasteur pipette cover each reaction site with approximately 15 µL of diluted serum.
- Place the slide in a moist chamber and incubate at 37 C for 30 minutes. **Important: From this point through Step 16, slides must be kept moist.**
- Five to ten minutes before the end of the incubation period, thaw an aliquot of guinea pig complement and immediately add the appropriate volume of cold Complement Diluent to obtain a working complement solution (See chart below). **Keep this reagent on ice during test procedure.**

# of slides in run	C' (µL) (freshly thawed)	C' diluent (mL)
1	10	0.4
2	20	0.8
3	30	1.2
4	40	1.6
5	50	2.0
6	60	2.4
7	70	2.8
8	80	3.2
9	90	3.6
10	100	4.0

- At the end of the incubation period, rinse slide briefly 3 times with a gentle stream of PBS, gently flicking slide between rinses (avoid directing stream at wells). Rinse again, and allow PBS to bead up on wells. Let slide sit in a moist chamber for 5-10 minutes.
- Holding slide upright, tap gently on a folded piece of paper towel to remove the PBS. **Do not allow the wells to dry.**
- Quickly add just enough cold working complement to cover each reaction site (approximately 15 µL).
- Repeat steps 7 and 8 until all slides are processed.
- Incubate the slides at 37 C in a moist chamber for 30 minutes.
- Wash as in step 6.
- Working with one slide at a time, hold slide and remove excess PBS with a gentle flick of the wrist. **Do not allow the wells to dry.**
- Add approximately 15 µL of Anti Guinea-Pig C3 to each reaction site.
- Repeat steps 12 and 13 until all slides are processed.
- Incubate the slide at 37 C in a moist chamber for 30 minutes.
- Rinse slide briefly 3 times with a gentle stream of PBS (avoid directing stream at wells).
- Air dry the slide by standing on end on absorbent toweling.
- Just before reading, add a sufficient amount of mounting fluid to each well to entirely cover the substrate when the cover slip is applied. Cover with a 22 x 50 mm, no. 1 cover slip. **NOTE:** Addition of too much mounting fluid may cause excessive movement of the cover slip. Addition of insufficient mounting fluid to a well may make part of the substrate unreadable.
- Read the slide at 200X magnification. If the slide cannot be read immediately, it may be stored in the dark at room temperature for up to 24 hours.

INTERPRETATION OF RESULTS

The reaction is POSITIVE when 20-40% of the cells in each field exhibit a greenish-yellow granular pattern of nuclear fluorescence against a contrasting red background. The EBV-NA antibody titer is the highest dilution of serum which produces a 1+ fluorescence. A positive reaction at a dilution of 1:10 or greater indicates the presence of antibody to EBV-NA. If desired, positive sera may be titered using two-fold serial dilutions.

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 1:10 dilution indicates no detectable antibody to EBV-NA.

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 provides a standard for checking test sensitivity. When titrated, it should exhibit a strong positive reaction at the 1:10 working dilution and diminish to a 1+ reaction at its stated titer. A day-to-day variance of one two-fold dilution on either side of the stated titer is considered acceptable performance.

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

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

EBV-NA antibodies are almost always present in sera containing IgG antibodies to VCA of EBV. However, NA is generally absent during the acute phase of IM. NA may be absent for several months post-acute infection. Patients with severe immunologic defects or immunosuppressive diseases may not have EBV-NA antibodies, even if antibodies to VCA are present.⁴

During convalescence, antibody titers to NA gradually increase and persist at moderate levels for life. Most healthy individuals previously exposed to EBV have antibody titers to EBV-NA that range from 1:10 to 1:160.⁴

In EBV-associated malignancies, levels of antibodies to NA of EBV are usually high in patients with nasopharyngeal carcinoma and can range from barely detectable to very high in patients with Burkitt's lymphoma.^{6,7}

MERIFLUOR EBV-NA Test results can be especially useful when correlated with results from other serological tests for EBV. For example, a patient with an IM-like illness caused by reactivation of a persistent EBV infection due to an immunosuppressive malignant or nonmalignant disease may demonstrate high titers of both IgM and IgG to EBV-VCA. However, if antibody to EBV-NA is also present, a diagnosis of primary EBV infection can be excluded.⁹

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. **Allowing wells to dry during the test procedure will invalidate the test results, usually giving a false negative reaction, and require the test to be repeated.**
2. Storage of complement under conditions other than those specified may result in decreased titers or negative reactions.
3. Anti-cell antibodies, if present in the serum, may interfere with the MERIFLUOR EBV-NA Test. However, this interference is easily discerned since the staining produced by these antibodies involves all of the cells, whereas antibody staining specific for EBV-NA involves only the 20-40% of the cells expressing EBV-NA.
4. Test results for antibodies to EBV-NA should be evaluated by clinicians in relation to patient symptoms, clinical history, and antibody response patterns to EBV-VCA and EA to establish a diagnosis.
5. Endpoint titers can vary depending on the type of microscope, light source, age of bulb, and filter system used.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The MERIFLUOR EBV-NA Test is a sensitive and rapid method for the qualitative and quantitative determination of antibodies to EBV-NA in human serum. It is of value in providing supportive information for the diagnosis of EBV-associated disease.

The sensitivity of each kit lot is controlled by testing with reference sera to ensure reproducible results from lot to lot. The reproducibility of the MERIFLUOR EBV-NA Test was evaluated and found to be within an acceptable range of one two-fold dilution. Test results from clinical studies and the testing of reference sera indicate the MERIFLUOR EBV-NA Test is specific for antibodies to NA of EBV and does not cross react with antibodies to the other herpesviruses. Clinical specimens from 106 patients were tested using the MERIFLUOR EBV-NA Test and another ACIF method. The MERIFLUOR EBV-NA Test demonstrated a relative sensitivity (70/71) of 98.6% and a specificity (35/35) of 100% compared to the reference method. The positive predictive value of the MERIFLUOR EBV-NA Test was 100% and the negative predictive value was 97.2%, for an overall predictive value of 99.1%.

Other ACIF	MERIFLUOR EBV-NA TEST	
	Neg	Pos
	Neg	70
Pos	1	35

Sensitivity = 98.6%
Specificity = 100.0%
PVN = 97.2%
PVP = 100.0%

ITALIANO

MERIFLUOR[®]

EBV-NA

Il test di Immunofluorescenza per gli anticorpi diretti contro EBV-NA

REF EN100

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

R: Only

FINALITÀ D'USO

Il test MERIFLUOR EBV-NA è basato su una tecnica rapida e sensibile, in immunofluorescenza anti-complemento (ACIF) per la ricerca qualitativa o quantitativa di anticorpi anti-antigene nucleare del virus di Epstein-Barr nel siero umano. Il test può dare indicazioni diagnostiche per facilitare il trattamento del paziente, se usato con altri test sierologici per EBV.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è un agente infettivo molto diffuso che comunemente causa infezioni nei bambini piccoli, che di solito sono asintomatiche oppure causano problemi di modesta entità. Tuttavia, i soggetti che contraggono l'infezione da EBV in età adulta spesso sviluppano la mononucleosi infettiva, con sintomi di febbre, faringite e linfadenopatia latero-cervicale. Nel 50% dei casi si ha splenomegalia.¹ Una serie di fattori, in particolare la capacità dell'individuo di produrre una risposta immunitaria, determinano l'espressione clinica della malattia. Le infezioni da EBV possono provocare complicanze a carico del Sistema Nervoso, del cuore, degli occhi, dell'apparato respiratorio, del sangue, dell'apparato digerente e renale.² In un articolo recentemente pubblicato, la riattivazione dell'infezione latente è stata sospettata come causa della Sindrome da stanchezza associata ad EBV.³

L'infezione da EBV è caratterizzata dalla presenza di numerosi antigeni e dai corrispondenti anticorpi. Tra questi antigeni, il capsidico virale (VCA), l'antigene precoce (EA) e l'antigene nucleare (NA) sono quelli più utili sotto il profilo diagnostico. All'inizio dell'infezione primaria da EBV si trovano livelli elevati di IgG anti-VCA, di IgM anti-VCA e di anticorpi anti-EA. I livelli di anticorpi anti-NA cominciano ad aumentare parecchie settimane o mesi dopo e rimangono a titoli misurabili (di solito 1:10-1:160) per tutto il resto della vita del paziente, a causa dello stato di portatore che si stabilisce dopo l'infezione primaria da EBV. La mancanza (o livelli molto bassi) di anticorpi anti-NA in presenza di IgG e IgM anti-VCA e di anticorpi anti-EA consente la diagnosi di un'infezione primaria acuta.^{4,5}

I pazienti con linfoma di Burkitt e con carcinoma rino-faringeo presentano elevati livelli di anticorpi anti-NA.^{6,7} Per contro, gli anticorpi anti-NA possono essere assenti nei soggetti immunodepressi o con gravi difetti immunologici.⁴

Il test in immunofluorescenza indiretta (IFA) è la tecnica più comunemente usata per la ricerca di anticorpi specifici anti-EBV. La ricerca di anticorpi anti-NA richiede una sensibilità maggiore e la tecnica ACIF rappresenta un metodo di facile lettura per determinare il titolo di anticorpi anti-NA nel siero umano.⁸

PRINCIPI BIOLOGICI

Il test MERIFLUOR EBV-NA è basato su una tecnica in immunofluorescenza anti-complemento (ACIF). Il siero del paziente in esame viene fatto reagire con il substrato contenente EBV-NA e se nel siero sono presenti anticorpi anti-EBV-NA, essi si legano all'antigene e non vengono rimossi dal lavaggio. A questo punto si aggiunge complemento di cavia (C') che si lega al complesso antigene-anticorpo. Pertanto, quando un siero anti-frazione C3 di complemento di cavia marcato con fluoresceina viene aggiunto nei pozzetti di reazione, esso si lega alla frazione C3 del complemento, cosicché le cellule infettate da EBV presentano una fluorescenza nucleare granulare 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-NA:** Preparati con cellule positive e negative per EBV-NA fissate. Circa il 20-40% delle cellule in ciascun pozzetto è rappresentato da cellule di linfoma di Burkitt (Raji) che esprimono l'antigene EBV-NA ma non possono produrre virioni infettanti. Le rimanenti cellule non esprimono l'antigene NA e servono per permettere una facile lettura ed un contrasto ottimale con le cellule positive. I vetrini, confezionati singolarmente, sono pronti all'uso una volta aperta la confezione. I vetrini non utilizzati sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservati a 2-8 C. Non usare il vetrino se lo stabilizzatore di umidità (linea al centro dello stabilizzatore) è cambiato da blu a rosa.

2. **Complemento di cavia (C'):** Liofilizzato. Ciascuna fialetta è sufficiente per circa 100 determinazioni. La prima volta che si usa, reidratarlo il contenuto di una fialetta di C' con 1 mL di acqua distillata sterile fredda (2-8 C) e successivamente suddividere in aliquote da 100 µL. Le aliquote devono essere tappate molto bene e congelate immediatamente a ≤ -20 C. Il C' ricostituito è stabile per 6 settimane a ≤ -20 C. **Una volta scongelate, le aliquote di C' non devono essere ricongelate e riutilizzate.**
3. **Diluente per il Complemento:** Contiene PBS con almeno 0,01% ciascuno di Ca++ e Mg++. Conservare a 2-8 C.
4. **Coniugato anti-C3 di cavia:** Liofilizzato. Siero (di capra) anti-frazione C3 del complemento di cavia, marcato con fluoresceina: deve essere ricostituito con 3 mL di PBS. Il coniugato contiene meno dello 0,1% di Blu di Evans come colorante di contrasto ed è standardizzato per l'uso con cianocian lo del kit. Il coniugato ricostituito può essere conservato fino a 2 settimane a 2-8 C oppure fino a 8 mesi a ≤ -20 C diviso in aliquote. Una volta scongelate le aliquote non devono essere ricongelate.
5. **Tampone Fosfato (polvere PBS):** Portare a 1 L con acqua distillata. Si ottiene così una soluzione 0,01 M di tampone fosfato, pH 7,5, contenente sodio azide. Se conservato a 2-8 C, il PBS reidratato è stabile indefinitamente.
6. **Controllo Positivo e Negativo (Vedere AVVERTENZE al punto 4):** Ciascuno, termoinattivato e liofilizzato. Ciascun siero di controllo (umano) deve essere ricostituito con 1 mL di PBS per preparare la soluzione di lavoro 1:10. Il titolo anticorpale del Controllo Positivo è stampato sull'etichetta del flaconcino. I sieri di controllo ricostituiti sono stabili per 6 settimane a 2-8 C oppure per 8 mesi a ≤ -20 C. Una volta scongelate le aliquote non devono essere ricongelate. I sieri di controllo sono stati inattivati a 56 C per 30 minuti e non devono essere reattivati prima dell'uso.
7. **Fluido di montaggio:** Il fluido di montaggio è una combinazione glicerolo-acqua, tamponata a pH 8,0, formulata per minimizzare l'eluzione del colorante di contrasto. E' pronto all'uso.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Materiale di laboratorio per sierologia: provette 12 x 75 mm, provetiere, pipette per sierologia e pipette Pasteur.
2. Beuta da 1 L.
3. Bagno di ghiaccio.
4. Acqua distillata.
5. Acqua distillata sterile.
6. Supporto per colorazioni.
7. Provette monouso con tappi a tenuta.
8. Camera umida.
9. Vetrini coprioggetto, 22 x 50 mm.
10. Termostato a 37 C.
11. Bagnomaria termostato a 56 C.
12. Microscopio a fluorescenza. Si consiglia l'uso di filtro di eccitazione FICT a luce blu e di un filtro di barriera a 515 nm, oppure qualsiasi sistema di filtri paragonabile a questo, per la microscopia a luce trasmessa (con condensatore per campo oscuro) e per quella a luce incidente (con specchio diroscopio 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 metalliche altamente esplosive. Quando si eliminano questi reagenti nelle condutture di scarico bisogna far scorrere molta acqua, per evitare l'accumulo di azide nei tubi.
3. La sodio azide è molto tossica in caso di ingestione. A contatto con acidi emette gas molto tossici. In caso di contatto con la cute, lavare immediatamente ed abbondantemente con acqua.
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

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

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

1. **Al momento dell'arrivo del kit, le due fiale di complemento devono essere tolte dalla scatola e conservate a ≤ -20 C.** Il resto del kit deve essere conservato in frigorifero (2-8 C).
2. Una volta ricostituiti i reagenti il kit è pronto all'uso.
3. Le buste singole contenenti i vetrini devono rimanere sigillate fino al momento dell'uso.
4. I reagenti ed i vetrini con l'antigene non devono essere usati oltre la data di scadenza.
5. Se i reagenti liofilizzati mostrano segni di reidratazione non devono essere utilizzati.
6. Per la conservazione a ≤ -20 C del complemento, del coniugato e dei sieri di controllo si consiglia di non utilizzare congelatori dotati di scongelamento automatico.
7. I componenti di questo kit sono stati testati e standardizzati come parte di un'unità. L'utilizzo di reagenti appartenenti a lotti diversi o preparati da altre Ditte può causare risultati insoddisfacenti.

RICCOLTA 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 microrganismi può provocare risultati errati, per cui è vivamente sconsigliato.

Prima di iniziare il test, un'aliquota del siero in esame deve essere riscaldata a 56 C per 30 minuti.

Se è sufficiente una ricerca qualitativa, i sieri devono essere testati ad una diluizione screening di 1:10. Se invece si preferisce una ricerca quantitativa, i sieri possono essere titolati preparando diluizioni seriali in base 2. Tutte le diluizioni dei campioni devono essere preparate con il tampone PBS.

PROCEDURA DEL TEST

1. Preparare la(e) diluizione(i) del siero riscaldato-inattivato del paziente usando il Tampone PBS.
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 30 minuti. **Importante: da questo punto fino al punto 16 della metodica i vetrini devono essere mantenuti umidi.**
5. 5-10 minuti prima della fine del periodo di incubazione, scongelare un'aliquota di complemento di cavia e aggiungere immediatamente il corretto volume di Diluente per il Complemento freddo per ottenere la soluzione di lavoro (vedi la Tabella successiva). **Tenere il flacone di complemento diluito in bagno di ghiaccio durante l'esecuzione del test.**

N. di vetrini in esame	C' (µL) (appena scong.)	Diluente C' (mL)
1	10	0,4
2	20	0,8
3	30	1,2
4	40	1,6
5	50	2,0
6	60	2,4
7	70	2,8
8	80	3,2
9	90	3,6
10	100	4,0

- Bain-marie à 56 C.
- Microscope à fluorescence. Un filtre à excitation à lumière bleue ITCF (isothiocyanate de fluorescéine) et un filtre barrière de 515 nm, ou tout système de filtre comparable, est recommandé pour la microscopie à lumière transmise utilisant un condensateur à champ sombre, et pour la microscopie à lumière incidente utilisant un miroir dichroïque de 500 nm.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.

ATTENTION

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

DANGER ET MISES EN GARDE

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

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

- Dès réception du coffret, les deux flacons de complément doivent être retirés et conservés à ≤ -20 C. Les autres composants du coffret doivent être conservés au réfrigérateur (2-8 C).
- Le coffret est prêt à l'emploi après reconstitution des réactifs.
- Les emballages des lames individuelles ne doivent être ouverts qu'au moment de leur utilisation.
- Les réactifs et les lames d'antigène ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption.
- Ne pas utiliser des réactifs lyophilisés montrant des signes de déshydratation.
- Les congélateurs auto-dégivrants ne sont pas recommandés pour la conservation du complément, du conjugué ou des sérums de contrôle.
- Chaque élément du coffret a été testé et standardisé par rapport aux autres. 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 aseptiquement par ponction veineuse, à température ambiante, puis centrifuger. Le sérum doit être séparé le plus rapidement possible et être réfrigéré (2-8 C) ou être congelé (≤ -20 C) s'il n'est pas testé au cours de la semaine. Les congélateurs auto-dégivrants ne sont pas recommandés en tant qu'unités de stockage. L'utilisation de sérums hémolysés, lipémiques ou montrant une croissance microbienne n'est pas recommandée.

Avant le test, une aliquote d'échantillon de sérum doit être chauffé à 56 C pendant 30 minutes de façon à inactiver le complément endogène. Pour des résultats qualitatifs, les sérums doivent être testés à la dilution 1:10. Pour des résultats quantitatifs, les sérums peuvent être titrés par dilutions successives d'un facteur 2. Toutes les dilutions de sérum doivent être préparées dans du PBS.

PROCEDURE DE TEST

- Préparer une ou plusieurs dilution(s) du sérum du patient inactivé à la chaleur, dans du PBS.
- Retirer la lame de son emballage.
- A l'aide d'une pipette Pasteur, couvrir chaque site de réaction avec environ 15 µL de sérum dilué.
- Placer la lame en chambre humide et incuber 30 minutes à 37 C. **Important: à partir de cette étape jusqu'à l'étape 16, les lames doivent être maintenues humides.**
- Cinq à dix minutes avant la fin de la période d'incubation, dégeler une aliquote de complément de cochon d'Inde et ajouter immédiatement le volume approprié de diluant du complément froid pour obtenir une solution de travail de complément (voir tableau ci-dessous). **Conserver ce réactif dans la glace durant le test.**

Nbre. de lames par série	C' (µL) (récemment dégelé)	Diluant C' (mL)
1	10	0,4
2	20	0,8
3	30	1,2
4	40	1,6
5	50	2,0
6	60	2,4
7	70	2,8
8	80	3,2
9	90	3,6
10	100	4,0

- A la fin de la période d'incubation, rincer la lame brièvement 3 fois avec un léger flux de PBS (éviter de diriger le flux directement sur les puits), et secouer doucement la lame entre chaque rinçage. Rincer à nouveau et laisser perler le PBS sur les puits. Incuber la lame 5 à 10 minutes en chambre humide.
- En tenant la lame verticalement, taper doucement sur un morceau de papier absorbant pour enlever le PBS. **Ne pas laisser sécher les puits.**
- Ajouter rapidement juste assez de solution de travail de complément froide pour couvrir chaque site de réaction (environ 15 µL).
- Répéter les étapes 7 et 8 jusqu'à ce que toutes les lames soient traitées.
- Incuber les lames en chambre humide, 30 minutes à 37 C.
- Laver comme à l'étape 6.
- En travaillant avec une seule lame à la fois, tenir la lame et ôter l'excédent de PBS avec un petit coup de poignet. **Ne pas laisser sécher les puits.**
- Ajouter environ 15 µL d'anti-C3 de cochon d'Inde sur chaque site de réaction.
- Répéter les étapes 12 et 13 jusqu'à ce que toutes les lames soient traitées.
- Incuber les lames en chambre humide, 30 minutes à 37 C.
- Rincer chaque lame brièvement 3 fois avec un léger flux de PBS (éviter de diriger le flux directement sur les puits).
- Laisser sécher les lames à l'air ambiant en les plaçant verticalement sur du papier absorbant.
- Juste avant la lecture, déposer suffisamment de liquide de montage sur chaque puits afin de couvrir entièrement le substrat lorsqu'on applique la lamelle couvre-objet. Couvrir avec une lamelle couvre-objet, 22 x 50 mm, n° 1.
N.B.: L'addition d'un excès de liquide de montage peut causer un mouvement excessif de la lamelle couvre-objet. L'addition d'une quantité insuffisante de liquide de montage dans un puits peut empêcher la lecture d'une partie du substrat.
- Lire les lames au grossissement 200X. Si les lames ne peuvent être lues immédiatement, elles peuvent être conservées à l'obscurité à température ambiante pendant 24 heures.

INTERPRETATION DES RESULTATS

La réaction est POSITIVE lorsque 20-40% des cellules de chaque champ donnent une fluorescence nucléaire granulaire jaune-verdâtre contrastant avec un fond rouge. Le titre des anticorps EBNA est l'inverse de la plus haute dilution de sérum produisant une fluorescence 1+. Une réaction positive à la dilution 1:10 ou plus indique la présence d'anticorps anti-EBNA. Si on le souhaite, le sérum positif peut être titré en procédant à des dilutions successives de 2 en 2.

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

CONTROLE DE QUALITE

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

Chaque coffret contient des sérums de contrôle positif et 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 contrôle positif constitue un standard permettant de vérifier la sensibilité du test. Lors de la titration, il doit présenter une réaction fortement positive à la dilution de travail 1:10 et diminuer jusqu'à une réaction 1+ au titre annoncé. Une variation inter-série d'un facteur de dilution 2 de part et d'autre du titre annoncé est considérée comme acceptable.

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

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

VALEURS ATTENDUES

Les anticorps anti-EBNA sont presque toujours présents dans les sérums contenant des anticorps IgG anti-EBV-VCA. Cependant les anticorps anti-EBNA sont en général absents lors de la phase aiguë de la MI, et peuvent demeurer absents pendant plusieurs mois après une infection aiguë. Les patients atteints de déficiences immunologiques graves ou de maladies immunodépressives peuvent ne pas avoir d'anticorps anti-EBNA, même si les anticorps anti-VCA sont présents.⁴

Au cours de la convalescence, les titres en anticorps anti-EBNA augmentent graduellement et persistent à des taux moyens durant toute la vie. La plupart des individus en bonne santé exposés préalablement au virus EBV ont des titres d'anticorps anti-EBNA allant de 1:10 à 1:160.⁴

Dans les maladies associées à l'EBV, les taux d'anticorps anti-EBNA sont généralement élevés chez les patients atteints de carcinome naso-pharyngien et peuvent varier d'un taux à peine détectable à un taux très élevé chez les patients atteints d'un lymphome de Burkitt.^{5,7}

Les résultats du test MERIFLUOR EBV-NA peuvent être particulièrement utiles lorsqu'ils sont corrélés avec les résultats des autres tests sérologiques EBV. Par exemple, un patient atteint d'une maladie ressemblant à une MI, causée par une réactivation d'une infection persistante à EBV due à une maladie immunodépressive maligne ou non, peut montrer des taux élevés d'IgM et d'IgG anti-EBV-VCA. Cependant si l'on retrouve également des anticorps anti-EBNA, le diagnostic d'une infection primaire à EBV peut être exclu.⁹

LIMITES DU TEST

- Le fait de laisser sécher les puits en cours de manipulation invalide les résultats du test en donnant habituellement une réaction faussement négative, et le test doit donc être recommencé.**
- La conservation du complément dans des conditions autres que celles spécifiées peut conduire à des titres plus bas ou des réactions négatives.
- Lorsqu'ils sont présents dans le sérum, les anticorps anti-cellules peuvent interférer avec le test MERIFLUOR EBV-NA. Cette interférence est toutefois facilement discernable car la coloration produite par ces anticorps implique toutes les cellules, alors que la coloration due aux anticorps spécifiques de l'EBNA implique uniquement les 20-40% de cellules exprimant l'EBNA.
- Pour établir un diagnostic, les résultats obtenus pour les anticorps dirigés contre l'EBNA doivent être interprétés par le clinicien en relation avec les symptômes du patient, son historique clinique et les images données par les réponses en anticorps dirigés contre l'EBV-VCA et l'EBV-EA.
- Les titres finals peuvent varier en fonction du type de microscope, de la source de lumière, de l'âge de l'ampoule et du système de filtre utilisé.

PERFORMANCES DU TEST

Le test MERIFLUOR EBV-NA est une méthode sensible et rapide pour la détermination qualitative et quantitative des anticorps anti-EBNA dans le sérum humain. Il permet d'apporter une information complémentaire pour le diagnostic des maladies associées à l'EBNA.

La sensibilité de chaque coffret est contrôlée en testant des sérums de référence pour assurer la reproductibilité de lot à lot. La reproductibilité du test MERIFLUOR EBV-NA a été évaluée et se situe dans un intervalle acceptable de ± un facteur de dilution 2. Les résultats des tests des études cliniques et les tests de sérums de référence indiquent que le test MERIFLUOR EBV-NA est spécifique pour les anticorps anti-EBNA et ne présente pas de réaction croisée avec les anticorps dirigés contre les autres herpesvirus. Des échantillons cliniques provenant de 106 patients ont été testés avec le test MERIFLUOR EBV-NA et une autre méthode ACIF. Le test MERIFLUOR EBV-NA a montré une sensibilité relative de 98,6% (70/71) et une spécificité de 100% (35/35) par rapport à la méthode de référence. La valeur prédictive positive (VPP) du test MERIFLUOR EBV-NA était de 100% et la valeur prédictive négative (VPN) était de 97,2% pour une valeur prédictive totale de 99,1%.

		MERIFLUOR EBV-NA	
		Neg	Pos
Autre ACIF	Neg	70	0
	Pos	1	35

Sensibilité = 98,6%
Spécificité = 100,0%
VPN = 97,2%
VPP = 100,0%

ESPAÑOL

MERIFLUOR[®]

EBV-NA

Prueba de Inmunofluorescencia Para Anticuerpos de EBV-NA

REF EN100

IVD Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

Rx Only

USO INDICADO

La prueba MERIFLUOR EBV-NA es un método fácil y sensible de inmunofluorescencia anti-complemento (IFAC) para la detección cualitativa y cuantitativa de anticuerpos contra el antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr (EBNA) en suero humano. Esta prueba puede proporcionar información de importancia diagnóstica que facilita el manejo del paciente, cuando ésta es usada junto con las otras pruebas para detectar anticuerpos contra el EBV.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El virus de Epstein-Barr tiene una patogenicidad ampliamente diseminada en los humanos, y causa infecciones en las etapas tempranas de la infancia, trayendo como resultado infección subclínica o enfermedad leve. Sin embargo, los individuos que contraen infección por el EBV durante la adolescencia, por lo general desarrollan un cuadro de mononucleosis infecciosa clásica con fiebre, faringitis y linfadenopatía cervical. Esplenomegalia se presenta en un 50% de los casos.¹ Las manifestaciones clínicas y patológicas de la enfermedad están determinadas por una serie de factores, en particular por la inmuno competencia del individuo. Las infecciones causadas por el EBV pueden traer como resultado complicaciones de los sistemas neurológico, cardíaco, ocular, respiratorio, hematológico, digestivo y renal.² Además, la reactivación de una infección latente también ha sido implicada en un síndrome de enfermedad persistente el cual ha sido referido en la literatura reciente con el nombre de Síndrome de Fatiga Asociado con el EBV.³

La infección por el EBV trae como resultado la expresión de varios antígenos y la formación de anticuerpos correspondientes. De estos, el antígeno de cápsida viral (VCA), el antígeno precoz (AP), y el antígeno nuclear (AN) son los de mayor utilidad diagnóstica. Niveles elevados de anticuerpos de tipo IgG e IgM contra ACV, y contra AP son encontrados durante el comienzo de la infección primaria. En cambio, los niveles de anticuerpos contra el AN comienzan a subir varias semanas o meses después y se mantienen a niveles detectables; normalmente con títulos entre 1:10 a 1:160 por tiempo indefinido debido a la persistencia del estado de portador viral que se establece después de la infección primaria por el EBV. La ausencia de niveles de anticuerpos contra el AN, o de niveles muy bajos de los mismos, en presencia de anticuerpos de tipo IgG, IgM y de anti-AP es característica de la infección primaria aguda.^{4,5}

Los pacientes con Linfoma de Burkitt y carcinoma nasofaríngeo se ha demostrado que producen niveles elevados de anticuerpos anti-AN.^{6,7} Por el contrario, los pacientes inmunosuprimidos o aquellos con deficiencias inmunológicas severas, pueden carecer de anticuerpos anti-AN.⁴

El método de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es el más usado para determinar la presencia de anticuerpos específicos contra el EBV. El análisis de anticuerpos contra el EBNA requiere de gran sensibilidad y la técnica de (IFAC) es una forma de fácil visualización para determinar títulos de anti-AN en suero humano.⁸

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

La prueba para determinar anticuerpos contra el EBNA utiliza el método de inmunofluorescencia anti-complemento (IFAC). En este método, el suero del paciente es puesto a reaccionar con el sustrato de EBNA. Si existen anticuerpos contra el EBNA, éstos se unirán al sustrato y no serán eliminados. Complemento (C) procedente de cobayo es añadido, el cual se une al complejo antígeno-anticuerpo. En seguida, cuando el conjugado de fluoresceína-anti C3 de cobayo es añadido en el lugar de reacción, el conjugado se unirá a la fracción C3 del complemento haciendo que las células infectadas por el EBV exhiban un patrón de fluorescencia granular cuando estas son observadas bajo un microscopio fluorescente.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

- Portaobjetos de sustrato de EBNA:** Cada una de ellas con células positivas y negativas para el EBNA fijadas en cada pocillo. Aproximadamente 20-40% de las células en cada pocillo provienen de la línea celular Raji, la cual es positiva para el EBNA pero no produce viriones infecciosos. El resto de las células no expresan el AN y sólo están presentes para facilitar la lectura y proporcionar un contraste óptimo con las células positivas. Las portaobjetos empacadas individualmente están listas para ser usadas tan pronto son removidas de los sobres de papel aluminio. Los portaobjetos almacenados entre 2-8 C son estables hasta la fecha descrita en el empaque de los portaobjetos. No use la lámina si el indicador del desecante (línea en el centro del desecante) ha cambiado de azul a rosa.
- Complemento (C) de cobayo:** Liofilizados, cada uno de los cuales contiene una cantidad suficiente para realizar 100 determinaciones. En el momento antes de usar, rehidrate un vial de C con 1 mL de agua destilada estéril y fría (2-8 C). Divídalo en alícuotas de 100 µL, tápelas muy bien e inmediatamente congélelas a ≤ -20 C. El complemento reconstituido es estable durante seis semanas a ≤ -20 C. **Las alícuotas descongeladas no deberán recongelarse y volverse a usar.**
- Diluyente de Complemento:** El cual contiene PBS con un mínimo de 0,01% de Ca++ y de Mg++. Almacénese entre 2-8 C.
- Anti C3 de cobayo (marcado con fluoresceína):** Conjugado (cabra) liofilizado. Reconstituir con 3 mL de PBS. Este conjugado contiene menos de 0,1% de azul de Evans como colorante de contraste y viene pre-titulado para usar con cada kit. El conjugado reconstituido puede ser almacenado hasta por dos semanas entre 2-8 C, o de otro modo, alícuotado y almacenado hasta por ocho meses a ≤ -20 C. Las alícuotas descongeladas no deben recongelarse.
- Buffer Salino Fosfato (PBS pulverizado):** Rehidrate el polvo con agua destilada hasta alcanzar un volumen total de 1 litro. El PBS rehidratado tiene una concentración de 0,01 M, un pH de 7,5 y contiene azida de sodio. El buffer de PBS rehidratado almacenado a una temperatura entre los 2-8 C es estable durante tiempo indefinido.
- Sueros Controles Positivo y Negativo (Vea Advertencia Paso 4):** Liofilizado. Cada suero control humano es reconstituido con 1 mL de PBS, lográndose una concentración final de trabajo de 1:10. El título del Control Positivo está escrito en el rótulo del mismo. Los sueros reconstituidos son estables durante seis semanas a una temperatura entre 2-8 C, o durante ocho meses a ≤ -20 C. Las alícuotas descongeladas no deben recongelarse. El suero control ha sido inactivado por calor a 56 C durante 30 minutos y no deberá volver a recalentarse.
- Líquido de Montaje:** El líquido de montaje viene tamponado a pH 8,0, y está formado por una combinación de glicerol-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 para 1 litro.
- Baño helado.
- Agua destilada.
- Agua destilada estéril.
- Recipiente para tinción.
- Tubos desechables con tapas de rosca.
- Cámara húmeda.
- Cubreobjetos N° 1 de 22 x 50 mm.
- Incubadora a 37 C.
- Baño serológico a 56 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. Evite que éste entre en contacto con la piel.
- El polvo de PBS contiene azida de sodio, la cual tiene el potencial de reaccionar con las tuberías de plomo o de cobre formando compuestos de azidas metálicas altamente explosivos. Al desechar los reactivos a través de tuberías, enjuague con cantidades copiosas de agua para prevenir que se formen depósitos de azidas en los desagües.
- La Azida de Sodio es bastante tóxica al ser ingerida. Al entrar en contacto con ácido, la azida emite un gas que resulta muy tóxico. En caso de que la piel llegue a entrar en contacto con esta azida, enjuáguela inmediatamente con agua en abundancia.
- Maneje las muestras, controles y materiales que entran en contacto con estos como si fueran material biológico potencialmente nocivo. El material que se usa para preparar el reactivo de control son probados a nivel del donante y fueron encontrados no reactivos para antígenos o materia nuclear asociada con, o anticuerpos a, los siguientes virus, según definido por licencia requerida de FDA: Virus humanos de inmunodeficiencia Tipo 1 y 2, virus de Hepatitis B y Hepatitis C. No obstante, y puesto que ningún método puede ofrecer seguridad absoluta de la ausencia de agentes infecciosos, estos materiales deberían manejarse al Nivel de Seguridad Biológica 2, como lo recomiendan los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de los Estados Unidos de Norteamérica en "Biosafety and Microbiological and Biomedical Laboratories" (Seguridad biológica y laboratorios microbiológicos y biomédicos).

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

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

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

- Tan pronto el kit es recibido, los dos viales de complemento deberán ser separados y almacenados a ≤ -20 C. El resto de los componentes del kit deberán ser almacenados en el refrigerador entre 2-8 C.
- Una vez los reactivos son reconstituidos el kit se considera listo para usar.
- Los sobres individuales de portaobjetos deberán mantenerse sellados hasta el momento justo antes de usarse.
- Tanto los reactivos como los portaobjetos con antígeno no deberán usarse después de la fecha de expiración descrita.
- En caso de que los reactivos liofilizados muestren signos de rehidratación, éstos no deberán ser usados.
- Los congeladores con descongelación automática no son recomendados para el almacenamiento de complemento, conjugado a suero.
- 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 sea posible y luego refrigerado a una temperatura entre 2-8 C, ó congelado a ≤ -20 C en caso de que éste no vaya a ser examinado en un lapso de una semana. Los congeladores con descongelación automática no son recomendados como unidades de almacenamiento. No es recomendada el uso de sueros que muestran hemólisis, lipemia o contaminación microbiana.

Antes de examinar, se recomienda que una alícuota de suero sea calentada a 56 C durante 30 minutos para inactivar el complemento endógeno.

Para obtener resultados cualitativos, el suero deberá ser examinado a una dilución de 1:10. Para obtener resultados cuantitativos, el suero puede ser titulado utilizando diluciones seriadas dobles. Todas las diluciones de suero deberán ser preparadas con PBS.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Prepare las diluciones de suero del paciente inactivado con PBS.
- Retire los portaobjetos de su envoltura de papel aluminio.
- Utilizando una pipeta Pasteur cubra cada pocillo con una cantidad aproximada de 15 µL de suero diluido.
- Coloque el portaobjetos dentro de una cámara húmeda e incube a 37 C durante 30 minutos. **Importante: Desde este paso hasta el paso 16, los portaobjetos deberán mantenerse húmedos.**
- De cinco a diez minutos antes de terminarse el período de incubación, descongele una alícuota de complemento de cobayo y añada de inmediato el volumen apropiado de Diluyente de Complemento frío para preparar la solución de trabajo de complemento (véase la tabla descrita más abajo). **Mantenga este reactivo dentro de un recipiente con hielo durante la realización de la prueba.**

Número de láminas a correr	C' (µL) recién descongelado	Diluyente de C' (mL)
1	10	0,4
2	20	0,8
3	30	1,2
4	40	1,6
5	50	2,0
6	60	2,4
7	70	2,8
8	80	3,2
9	90	3,6
10	100	4,0

- Al finalizar el período de incubación enjuague los portaobjetos brevemente con un chorro suave de PBS, sacudiendo los portaobjetos ligeramente entre cada enjuague, y evitando dirigir el chorro directamente a los pocillos. Enjuague de nuevo y permita que el PBS forme gotas en los pocillos. Deje que los portaobjetos se mantengan sumergidos en una solución fresca de PBS recién preparado durante 5-10 minutos.
- Manteniendo los portaobjetos parados, sacúda suavemente sobre una toalla de papel absorbente doblada para remover el PBS. **No permita que los pocillos se sequen.**
- Rápidamente añada tan sólo la cantidad requerida de complemento frío para cubrir cada pocillo de reacción (aproximadamente 15 µL).
- Repita los pasos 7 y 8 hasta que todas las portaobjetos sean procesados.
- Incuba a 37 C en cámara húmeda durante 30 minutos.
- Lave del mismo modo que fue descrito en el paso 6.
- Trabajando con una portaobjeto a la vez, sujete el portaobjeto y retire el exceso de PBS sacudiendo la muñeca ligeramente. **No permita que los pocillos se sequen.**
- Añada aproximadamente 15 µL de anti-C3 de cobayo en cada pocillo de reacción.
- Repita los pasos 12 y 13 hasta que todos los portaobjetos sean procesados.
- Incuba los portaobjetos a 37 C en cámara húmeda durante 30 minutos.
- Enjuague los portaobjetos 3 veces gentilmente con PBS (evite dirigir el lavado directamente al pocillo).
- Deje que los portaobjetos se sequen al aire colocándolas recostadas sobre un borde encima de una toalla de papel absorbente.
- Justo antes de leer, añada una cantidad suficiente de líquido de montaje a cada pocillo, de modo que todo el sustrato quede cubierto cuando el cubreobjeto sea colocado. Cubra con un cubreobjetos N° 1 de 22 x 50 mm. **NOTA:** La adición de líquido de montaje en exceso puede causar un movimiento excesivo del cubreobjetos. De otro modo, la adición insuficiente del mismo puede hacer que parte del sustrato sea imposible de leer. Lea los portaobjetos a una magnificación de 200X dentro de un lapso de 24 horas. Almacénelas en oscuro hasta antes de leer y luego descártelas.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La reacción se considera POSITIVA cuando el 20-40% de las células en cada campo visual exhiben un patrón granular de fluorescencia nuclear de color amarillo-verdoso contra un fondo de contraste de color rojo. El título de anticuerpo para el EBNA es el recíproco de la dilución más alta de suero, el cual produce una fluorescencia de una cruz 1+. Una reacción positiva a una dilución de 1:10 indica la presencia de anticuerpos de tipo IgG contra el EBNA.

La reacción se considera NEGATIVA cuando las células no fluorescen de color amarillo verdoso o exhiben menos de 1+ de reacción en la dilución de tamizaje. Una reacción negativa a una dilución de 1:10 indica la ausencia de anticuerpos detectables contra el EBNA.

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales. Cada kit contiene Sueros Controles Positivo y Negativo los cuales deberán ser ensayados cada vez que la prueba sea realizada.

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

El Control Positivo proporciona un estándar para chequear la sensibilidad de la prueba. Cuando éste es titulado, deberá exhibir una reacción positiva fuerte a la dilución de trabajo de 1:10 y disminuir hasta una reacción igual a una cruz: 1+, como se mencionó anteriormente. Una variabilidad día a día de un título seriado doble en la dilución, el cual puede ser mayor o menor que el título especificado se considera funcionamiento aceptable.

En caso de que la prueba no sea válida 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 de la prueba no deberán ser reportados en tanto que la condición o condiciones no sean corregidas. Como primer paso para determinar la causa de esta falla, repita los test de control.

Se pueden correr controles adicionales de acuerdo a los requisitos de regulaciones o organizaciones acreditadas locales, de estado, y/o federales. Se puede referir a "Clinical Laboratory Medicine – In Vitro Diagnostic Medical Devices – Validation of User Quality Control Procedures by the Manufacturer (ISO/FDIS 15199)" para más información a cerca de prácticas de control de calidad.

VALORES ESPERADOS

Los anticuerpos contra el EBNA casi siempre están presentes en sueros que contienen anticuerpos de tipo IgG contra el ACV del EBV. Sin embargo, el AN por lo general se encuentra ausente durante la fase aguda de la MI. Además, el AN puede estar ausente durante varios meses después de una infección aguda. Los pacientes con deficiencias inmunológicas severas o enfermedades que ocasionan inmunosupresión es posible que no produzcan anticuerpos contra el EBNA, aún cuando si lo hagan contra el ACV.⁴

Durante la convalescencia, los títulos de anticuerpos contra el AN aumentan gradualmente y se mantienen en niveles moderados de por vida. La mayoría de individuos sanos expuestos al EBV poseen títulos de anticuerpos contra el EBNA cuyo rango fluctúa entre 1:10 a 1:160.⁴

En las enfermedades malignas asociadas con el EBV, los niveles de anticuerpos contra el AN del EBV por lo general son altos en aquellos pacientes con carcinoma nasofaríngeo y pueden variar desde niveles escasamente detectables hasta niveles extremadamente altos en pacientes con linfoma de Burkitt.^{6,7}

Los resultados de la prueba del MERIFLUOR EBV-NA pueden resultar bastante útiles cuando estos son correlacionados con los resultados obtenidos en otras pruebas serológicas para el EBV. Por ejemplo, un paciente con una enfermedad que asemeja una MI ocasionada por reactivación de una infección persistente con el EBV, debido a una enfermedad inmunosupresora ya sea maligna o no maligna, puede presentar títulos altos tanto de IgM como de IgG contra el ACV-EBV. Sin embargo, si el anticuerpo contra el EBNA también está presente, el diagnóstico de infección primaria por el EBV puede ser excluido.⁹

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los resultados de la prueba se invalidan si los portaobjetos se dejan secar durante el procedimiento; por lo general esto ocasiona reacciones negativas falsas que requieren que la prueba sea repetida.
- El almacenamiento del complemento en condiciones diferentes de aquellas que son especificadas puede ocasionar el que se obtengan títulos falsamente disminuidos o inclusive reacciones negativas.
- La presencia de anticuerpos antiluciferasas presentes en el suero puede resultar en interferencias con la prueba de MERIFLUOR EBV-NA. Sin embargo, esta interferencia es fácilmente discernible ya que el patrón de tinción producido por estos anticuerpos involucra a todas las células, mientras que la tinción de anticuerpos específicos contra el EBNA tan sólo involucra del 20-40% de las células que expresan el EBNA.
- Los resultados de la prueba para detectar anticuerpos contra el EBNA deberán ser evaluados por los profesionales de la medicina en relación con los síntomas del paciente, su historia clínica y los patrones de respuesta inmune contra el ACV-EBV y el AP para establecer el diagnóstico.
- 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.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La prueba MERIFLUOR EBV-NA es un método sensible y rápido para la determinación cualitativa y cuantitativa de anticuerpos contra el EBNA en suero humano. Esta prueba tiene valor pues proporciona información de soporte para el diagnóstico de la enfermedad asociada con el EBV.

La sensibilidad de cada lote del kit es controlada probando sueros de referencia para asegurar que los resultados entre lote y lote sean reproducibles. La reproducibilidad de la prueba de MERIFLUOR EBV-NA fue evaluada y se encontró que esta se encontraba dentro de un rango aceptable de una dilución seriada doble. Los resultados obtenidos en estudios clínicos y al examinar sueros de referencia indican que la prueba de MERIFLUOR EBV-NA es específica para anticuerpos contra el EBNA y que no presenta reactividad cruzada con anticuerpos de tipo IgG contra otros virus de la familia del herpes. Las muestras de suero de 106 pacientes fueron evaluadas con la prueba de MERIFLUOR EBV-NA y con otro método de IFAC. La prueba de MERIFLUOR EBV-NA demostró una Sensibilidad relativa de 98,6% (70/71), y una Especificidad de 100% (35/35) al ser comparada con el método de referencia. El Valor de Predicción Positiva para la prueba de MERIFLUOR EBV-NA fue de 100%, y de Predicción Negativa fue de 97,2%, lo que dio un valor predecible total de 99,1%.

Otro IFAC	MERIFLUOR EBV-NA	
	Neg	Pos
	70	0
	Neg	Pos
1	35	

Sensibilidad = 98,6%
Especificidad = 100,0%
Valor de Predicción Negativa = 97,2%
Valor de Predicción Positiva = 100,0%

DEUTSCH

MERIFLUOR®

EBV-NA

Immunfluoreszenztest für den Nachweis der EBV-NA-Antikörper

REF EN100

IVD In-Vitro-Diagnostikum

R. Only

VERWENDUNGSZWECK

Der MERIFLUOR EBV-NA Test ist ein sensitiver, schneller Anti-Komplement Immunfluoreszenztest (ACIF) für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Antikörpern gegen das nukleäre Antigen (EBNA) des Epstein-Barr-Virus (EBV) in Humanserum. Bei vorschriftsmäßiger Durchführung bietet der EBNA-Test wertvolle diagnostische Informationen, die in Verbindung mit anderen EBV-Antikörpertests, die Behandlung der Patienten erleichtern.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Das Epstein-Barr-Virus ist ein weit verbreiteter, menschlicher Krankheitserreger, der im allgemeinen zu Infektionen während der frühen Kindheit führt, die entweder asymptomatisch oder als eine milde Erkrankung verlaufen. Personen, die eine EBV-Infektion erst im jungen Erwachsenenalter durchlaufen, entwickeln oft eine klassische infektiöse Mononukleose (IM) mit Fieber, Pharyngitis und Lymphadenopathien. Bei 50% der Fälle entwickelt sich eine Splenomegalie.¹ Eine Vielzahl von Faktoren, im Besonderen die Immunkompetenz der Patienten, bestimmen den klinischen und pathologischen Verlauf der Erkrankung. Komplikationen einer EBV-Infektion können Nerven und Herz, Augen, Atemröhren, Verdauungstrakt und die Nieren betreffen.² Reaktivierungen latenter Infektionen wurden auch mit einer persistierenden Erkrankung in Verbindung gebracht, die in der Literatur als EBV-assoziiertes Müdigkeitssyndrom bezeichnet wird.³

Auf eine EBV-Infektion folgt die Expression vieler Antigene mit entsprechenden Antikörperantworten. Die aus diagnostischer Sicht wichtigsten Antigene sind: virales Capsid Antigen (VCA), „Early“ Antigen (EA) und nukleäres Antigen (EBNA). Bei „Ausbruch“ einer primären EBV-Infektion sind die VCA-IgG-, VCA-IgM- und EA-Antikörpertiter erhöht. EBNA-Antikörper werden erst einige Wochen oder Monate danach gebildet und persistieren aufgrund des viralen „Carrier-Status“ als Folge einer primären EBV-Infektion in einem möglichen Bereich von 1:10-1:160. Das Fehlen bzw. der Nachweis nur sehr geringer EBNA-Antikörpermengen bei gleichzeitiger Anwesenheit von IgG-, IgM- und EA-Antikörpern ist für die Feststellung einer akuten EBV-Primärinfektion hilfreich.^{4,5}

Patienten, die unter einem Burkitt-Lymphom bzw. unter einem Nasopharynxkarzinom leiden, zeigen hohe EBNA-Antikörpertiter.^{6,7} Im Gegensatz dazu sind EBNA-Antikörper bei immunsupprimierten Patienten oder bei Patienten mit schweren immunologischen Defekten nicht nachweisbar.⁴

Der indirekte Immunfluoreszenz-Antikörper-Test ist eine weit verbreitete Methode zur Bestimmung von EBV-spezifischen Antikörpern. Der Nachweis der EBNA-Antikörper erfordert hohe Sensitivität und die ACIF-Technik ist eine leicht ablesbare Methode, um EBNA-Titer in Humanserum nachzuweisen.⁸

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Für den Nachweis der EBNA-Antikörper wird die Methode des Anti-Komplement Immunfluoreszenztests (ACIF) eingesetzt. EBV-infizierte Zellen, die auf dem Objektträger fixiert sind, werden mit Patientenseren beschichtet. Vorhandene Antikörper binden sich an die viralen Antigene. Meerschweinchenkomplement wird zugegeben und bindet sich an die Antigen-Antikörperkomplexe. Anschließend wird Fluorescein markiertes Anti-C3 hinzugefügt, das sich an die C3-Komponente des Komplements bindet und ein fluoreszierendes, granuläres Muster des Zellkerns verursacht, das mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wird.

REAGENZ/ENTHALTENE MATERIALIEN

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

- EBNA beschichtete Objektträger:** Auftragsstellen beschichtet mit EBNA positiven und negativen Zellen. Ca. 20-40% der Zellen sind Burkitt Lymphom (Raji) Zellen, die EBNA positiv sind, aber keine infektiösen EBV-Virionen bilden können. Die restlichen Zellen exprimieren kein EBNA und erlauben damit ein leichtes Ablesen der Ergebnisse und einen optimalen Kontrast zu den positiven Zellen. Nach Entfernen der Verpackung sind die Objektträger gebrauchsfertig. Ungeöffnete Objektträger sind bei Lagerung von 2-8 C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Verwenden Sie keine Objektträger, wenn die Anzeige des Trockenmittels (die Linie in der Mitte des Trockenmittels) die Farbe von Blau zu Rosa geändert hat.
- Meerschweinchenkomplement (C):** Lyophilisiert, jedes Fläschchen reicht für ca. 100 Bestimmungen. Vor dem ersten Gebrauch den Inhalt des Fläschchens in 1 mL kaltem (2-8 C) sterilisiertem destilliertem Wasser lösen und in 100 µL Aliquots abfüllen. Die Aliquots sollten gut verschlossen und sofort bei ≤ -20 C eingefroren werden. Rekonstituiertes Komplement ist 6 Wochen bei ≤ -20 C haltbar. **Bereits aufgetaute Aliquots sollten nicht wieder eingefroren und wiederverwendet werden.**
- Komplementverdünnungspuffer:** Inhalt PBS mit ≥ 0,01% Ca++ und Mg++. Bei 2-8 C lagern.
- FITC-markiertes Anti-Meerschweinchen C3 (Ziege):** Lyophilisiert mit 3 mL PBS rekonstituieren. Dieses Konjugat enthält < 0,1% Evans Blau zur Gegenfärbung. Rekonstituiertes Konjugat ist 2 Wochen bei 2-8 C oder aliquotiert und bei ≤ -20 C gelagert 8 Monate haltbar. Aufgetaute Aliquots sollten nicht mehr eingefroren werden.
- PBS-Pulver:** Inhalt in 1 L Aqua dest. auflösen. Die gebrauchsfertige Lösung ist 0,01 M, Phosphatpuffer, pH 7,5 mit 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 und hitzeinaktiviert, jeweils mit 1 mL PBS verdünnen – ergibt eine 1:10 Verdünnung. Der Titer der Positivkontrolle ist auf dem Etikett aufgedruckt. Die verdünnten Seren sind 6 Wochen bei 2-8 C oder 8 Monate bei ≤ -20 C haltbar. Aufgetaute Aliquots sollten nicht wieder eingefroren werden. Die Kontrollseren wurden bei 56 C 30 min hitzeinaktiviert und sollten vor Gebrauch nicht erneut erhitzt werden.
- Eindeckmittel:** Das Eindeckmittel besteht aus einem Glycerol-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
- Eisbad
- Destilliertes Wasser
- Steriles destilliertes Wasser
- Färbeküvette
- Wattestäbchen, saugfähige Tücher
- Feuchte Kammer
- Deckgläser, Nr. 1, 22 x 50 mm
- Inkubator, 37 C
- Wasserbad, 56 C
- Ein Fluoreszenzmikroskop mit FITC Blaulichfiltersystem Sperrfilter (515 nm) oder ein vergleichbares Filtersystem zur Bestimmung des Fluoreszeins wird ebenso für die Durchlichtmikroskopie mit Dunkelkfeldkondensator als auch für die Auflichtmikroskopie bei Verwendung eines dichromatischen Spiegels (500 nm) empfohlen.

VORSICHTSMASSNAHMEN

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

WARNUNG

- Das Konjugat enthält Evans Blau als Farbstoff zur Gegenfärbung. Der Farbstoff kann krebserregend sein. Hautkontakt vermeiden!
- Das PBS-Pulver enthält Natriumazid, das mit Blei- oder Kupferrohren reagiert und zu potentiell explosiven Metallazid-Verbindungen führen kann. Für die Beseitigung der natriumazidhaltigen Reagenzien sollten größere Mengen Wasser benutzt werden, um eine Metallazidbildung zu verhindern.
- Natriumazid ist bei Verschlucken hoch giftig, bei Kontakt mit Saure 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 lizensierte 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

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

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

- Nach Erhalt des Kits, die zwei Fläschchen Komplement herausnehmen und bei ≤ -20 C lagern.** Die restlichen Kitkomponenten werden im Kühlschrank bei 2-8 C gelagert.
- Der Kit ist nach Rekonstitution der Reagenzien gebrauchsfertig.
- Gefrierschränke mit Abtauautomatik sind zur Lagerung des Komplements, des Konjugats und der Kontrollseren ungeeignet.
- Einzelne Objektträger erst kurz vor Gebrauch aus der Verpackung nehmen.
- Reagenzien und Objektträger dürfen nach dem aufgedruckten Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden.
- Sollten lyophilisierte Reagenzien Anzeichen einer Rehydratation aufweisen, sollten sie nicht verwendet werden.
- Die Komponenten dieses Kits wurden als Einheit geprüft und standardisiert. Die Verwendung von Bestandteilen anderer Chargen oder Herstellern kann zu unbefriedigenden Resultaten führen.

PROBENGEWENNUNG UND VORBEREITUNG

Blut durch Venenpunktion entnehmen, bei Raumtemperatur vollständig gerinnen lassen und zentrifugieren. Das Serum sollte so schnell wie möglich abgetrennt und gekühlt werden (2-8 C) oder, falls es innerhalb einer Woche nicht getestet wird, bei ≤ -20 C eingefroren werden. Serumproben sollten nicht wiederholt aufgetaut und eingefroren werden. Gefrierschränke mit Abtauautomatik sind zur Lagerung ungeeignet. Die Verwendung hämolytischer, lipämischer oder mit Mikroorganismen kontaminierte Seren wird nicht empfohlen.

Aliquots der Patientenseren vor Testdurchführung 30 min bei 56 C erhitzen, um das endogene Komplement zu inaktivieren. Zur qualitativen Auswertung sollten die Seren bei einer 1:10 Verdünnung getestet werden. Zur quantitativen Auswertung können die Seren durch zweifache Verdünnungen titriert werden. Alle Serenverdünnungen mit PBS ansetzen.

TESTDURCHFÜHRUNG

- Verdünnungen der hitzeinaktivierten Patientenseren mit PBS ansetzen.
- Objektträger aus der Folie nehmen.
- Mit Hilfe einer Pasteurpipette verdünnte Seren (ca. 15 µL) auf die Antigenfelder auftragen, so daß sie bedeckt sind.
- Objektträger in die feuchte Kammer legen, 30 min bei 37 C inkubieren. **Wichtig: von Schritt 4 bis einschließlich Schritt 16 müssen die Antigenfelder feucht gehalten werden.**

5. 5-10 min vor Ende der Inkubation, ein Aliquot des Meerschweinchenkomplements aufbauen und sofort das entsprechende Volumen des kalten Komplementverdünnungspuffers hinzufügen (siehe untere Tabelle). **Die Komplementlösung sollte während des gesamten Pipettiervorganges im Eisbad stehen.**

Anzahl Objektträger	Meerschweinchenkomplement (µL) Frisch aufgetaut	Komplementverdünnungspuffer (mL)
1	10	0,4
2	20	0,8
3	30	1,2
4	40	1,6
5	50	2,0
6	60	2,4
7	70	2,8
8	80	3,2
9	90	3,6
10	100	4,0

6. Objektträger nach der Inkubationszeit 3 x vorsichtig mit PBS abspülen. Flüssigkeitsstrahl nicht direkt auf die Auftragsfelder richten. Objektträger 5-10 min in der feuchten Kammer stehen lassen.
7. Überschüssige PBS durch Abschlagen oder vorsichtiges Abwischen entfernen. **Die Antigenfelder dürfen nicht antrocknen.**
8. Anschließend sofort kalte Komplementlösung auf die Auftragsfelder geben (ca. 15 µL).
9. Schritte 7 und 8 nacheinander mit allen Objektträgern wiederholen.
10. Objektträger in die feuchte Kammer legen und für 30 min bei 37 °C inkubieren.
11. Waschen wie in Punkt 6 beschrieben.
12. Das überschüssige PBS durch Abschlagen von den Objektträgern entfernen. **Die Antigenfelder dürfen nicht antrocknen.**
13. Ca. 15 µL Anti-C3 auf die Antigenfelder pipettieren.
14. Schritte 12 und 13 nacheinander mit allen Objektträgern wiederholen.
15. Objektträger in der feuchten Kammer 30 min bei 37 °C inkubieren.
16. Objektträger nach der Inkubationszeit 3 x vorsichtig mit PBS abspülen. Flüssigkeitsstrahl nicht direkt auf die Auftragsfelder richten.
17. Objektträger auf ein absorbierendes Tuch legen und lufttrocknen lassen.
18. Kurz vor dem Ablesen genügend Eindeckmittel auf jedes Feld geben, damit beim Auflegen des Deckgläschens (Nr. 1, 22 x 50 mm) das Substrat vollständig abgedeckt ist.
Achtung: Zugabe von überschüssigem Eindeckmittel kann ein verstärktes Bewegen des Deckgläschens verursachen. Zu wenig Eindeckmittel kann zur Unlesbarkeit von Teilen des Substrats führen.
19. Ergebnisse bei 200 facher Vergrößerung ablesen. Werden die Objektträger nicht sofort ausgewertet, können sie im Dunkeln bei Raumtemperatur bis zu 24 Stunden gelagert werden.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Das Ergebnis ist POSITIV, wenn die infizierten Zellen in jedem Feld (ca. 20-40% der Zellen) eine deutliche grüneligliche granuläre Fluoreszenz zeigen. Die restlichen Zellen erscheinen als roter Hintergrund. Der EBNA-Antikörpertiter ergibt sich aus der höchsten Serumverdünnung, die noch eine 1+ Reaktion zeigt. Eine positive Reaktion bei einer 1:10 Verdünnung oder größer deutet auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen EBNA hin. Falls gewünscht, können positive Seren in zweifachen Verdünnungen ausstitriert werden.

Ein NEGATIVES Ergebnis liegt vor, wenn die Zellen nicht fluoreszieren und alle Zellen aufgrund der Gegenfärbung rot erscheinen oder weniger als eine 1+ Reaktion in der Screening-Verdünnung zeigen. Ein negatives Ergebnis mit der Screening-Verdünnung deutet auf keine nachweisbaren EBNA-Antikörper hin.

QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

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

Die Positivkontrolle bietet sich als Standard zum Überprüfen der Testsensitivität an. Wird das Kontrollserum ausstitriert, sollte es mit der Screening-Verdünnung stark positiv reagieren und bei dem auf dem Etikett aufgedruckten Titer auf eine 1+ Reaktion abfallen. Abweichungen um eine Titerstufe in beide Richtungen liegen innerhalb der Toleranzgrenze. Zeigen die Kontrollen nicht die erwarteten Resultate, ist der Testdurchlauf ungültig.

Liegen die Werte für die Positiv- und Negativkontrolle nicht innerhalb des spezifizierten Bereichs, ist der Test nicht auswertbar, 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) 800-3343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Distributor. Testergebnisse sollten nicht weitergeleitet werden, solange die Testbedingungen nicht korrigiert wurden.

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

ERWARTETE WERTE

EBNA-Antikörper sind in fast allen Seren, die auch EBV-CA IgG-Antikörper enthalten, nachzuweisen. Jedoch sind während der akuten Phase einer infektiösen Mononukleose (IM) EBNA-Antikörper normalerweise nicht feststellbar. Auch in den ersten Monaten einer post-akuten Infektion können EBNA-Antikörper ebenfalls ausbleiben. Bei Patienten mit schweren immunologischen Defekten oder immunsuppressiven Erkrankungen werden unter Umständen keine EBNA-Antikörper gebildet, auch wenn Antikörper gegen EBV-CA vorhanden sind.⁴

Während der Konvaleszenz steigen die EBNA-Antikörpertiter langsam an und sind lebenslang mit niedrigen Titern nachweisbar. Bei den meisten gesunden Personen, die bereits mit EBV infiziert sind, liegen die EBNA-Antikörpertiter zwischen 1:10 und 1:160.⁴

Bei Patienten mit Nasopharynxkarzinomen liegen die EBNA-Titer sehr hoch und können bei Patienten mit Burkitt Lymphom von kaum nachweisbaren Titern bis zu sehr hohen Titern variieren.^{6,7}

Die Ergebnisse des MERIFLUOR EBV-NA Tests sind vor allem in Verbindung mit den Ergebnissen anderer serologischer EBV-Tests sehr hilfreich. Zum Beispiel kann ein Patient mit IM-ähnlicher Erkrankung, die durch Reaktivierung einer persistierenden EBV-Infektion verursacht wurde, aufgrund einer immunsupprimierten bösartigen oder nichtbösartigen Erkrankung hohe IgM- und IgG- Titer gegen EBV-CA bilden. Sind Antikörper gegen EBNA nachzuweisen, kann die Diagnose einer primären EBV-Infektion ausgeschlossen werden.⁹

EINSCHRÄNKUNGEN

- Sofern die Antigenfelder während der Testdurchführung eintrocknen, werden üblicherweise falsch negative Ergebnisse erzielt. Damit wird der Test ungültig und muß wiederholt werden.
- Wird das Komplement unter anderen Bedingungen gelagert als angegeben, kann dies zu niedrigeren Titern oder auch negativen Ergebnissen führen.
- Anti-Zell-Antikörper können, falls im Serum vorhanden, den MERIFLUOR EBV-NA Test beeinflussen. Jedoch sind die für Autoantikörper typischen Muster (alle Zellen fluoreszieren) leicht vom EBNA-Muster zu unterscheiden, bei dem nur die 20-40% der Zellen, die auch EBNA exprimieren, eine Fluoreszenz zeigen.
- Testergebnisse der EBNA-Antikörper sollten immer zusammen mit der klinischen EBV-Symptomatik, der Anamnese und anderer Antikörpertests gegen VCA und EA ausgewertet werden.
- Endpunkttiter können aufgrund des verwendeten Mikroskoptyps, der Lichtquelle, Alter der Lichtquellen und des eingesetzten Filtersystems variieren.

LEISTUNGSMERKMALE

Der MERIFLUOR EBV-NA Test stellt ein sensitives und schnelles Verfahren für den qualitativen und quantitativen Nachweis von Antikörpern gegen EBNA im Humanserum dar. Er liefert wichtige unterstützende Informationen bei der Diagnose einer EBV-assoziierten Erkrankung.

Die Sensitivität jedes Kits wird mit Referenzseren kontrolliert, um reproduzierbare Ergebnisse von Charge zu Charge zu gewährleisten. Die Reproduzierbarkeit des MERIFLUOR EBV-NA Tests wurde evaluiert und liegt im Bereich von einer Titerstufe innerhalb der Toleranzgrenze. Test-ergebnisse klinischer Studien und der Referenzseren zeigen, daß der MERIFLUOR EBV-NA Test spezifisch für den Nachweis von EBNA-Antikörpern ist und nicht mit Antikörpern gegen andere Herpesviren kreuzreagiert. 106 Serumproben wurden im MERIFLUOR EBV-NA Test und einem anderen ACIF-Test eingesetzt und die Ergebnisse verglichen. Der MERIFLUOR EBV-NA Test zeigt eine relative Sensitivität (70/71) von 98,6% und eine Spezifität (35/35) von 100% im Vergleich zur Referenzmethode. Der positive prädiktive Wert für den MERIFLUOR EBV-NA Test liegt bei 100%, der negative prädiktive Wert bei 97,2% und der Durchschnitt bei 99,1%.

		MERIFLUOR EBV-NA	
		Neg	Pos
Anderer ACIF	Neg	70	0
	Pos	1	35

Sensitivität = 98,6%
Spezifität = 100,0%
Negativer Prädiktiver Wert = 97,2%
Positiver Prädiktiver Wert = 100,0%

REFERENCES

- Evans AS and Niederman JC. Epstein-Barr Virus. In *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. 2nd ed. Evans, ed. Plenum Medical. New York, 1982.
- Gotlieb-Stematsky T. and Glaser R. Association of Epstein-Barr Virus with Neurologic Diseases. In *Human Herpesvirus Infections: Clinical Aspects*. Glaser and Gotlieb-Stematsky, eds. Marcel Dekker. New York, 1982.
- Sumaya CV. Infectious Mononucleosis and Other EBV Infections: Diagnostic Factors. *Laboratory Management* 1986;24:37-46.
- Henle W, Henle G, and Horwitz CA. Infectious Mononucleosis and Epstein-Barr Virus Associated Malignancies. In *Diagnostic Procedures for Viral Rickettsial and Chlamydial Infection*. 5th ed. Lenette and Schmidt, eds. American Public Health Association, Inc. Washington, D.C., 1979.
- Henle G, et al. Rheumatoid Factor as a Cause of Positive Reactions in Tests for Epstein-Barr Virus-Specific IgM Antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 1979;36:415-22.
- Lindahl T, et al. Relationship Between Epstein-Barr Virus (EBV) DNA and the EBV-Determined Nuclear Antigen (EBNA) in Burkitt Lymphoma Biopsies and Other Lymphoproliferative Malignancies. *Int. J. Cancer* 1974;13:764-72.
- Huang DP, et al. Demonstration of Epstein-Barr Virus-Associated Nuclear Antigen in Nasopharyngeal Carcinoma Cells from Fresh Biopsies. *Int. J. Cancer* 1974;14:580-88.
- Ernberg I and Klein G. EB Virus-Induced Antigens. In *The Epstein-Barr Virus*. Epstein and Achong, eds. Springer-Verlag, Berlin. 1979.
- Henle W and Henle G. The Virus as the Etiologic Agent of Infectious Mononucleosis. In *The Epstein-Barr Virus*. Epstein and Achong, eds. Springer Verlag, Berlin. 1979.



SN11748

REV. 02/16



Manufactured By

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



Authorized Representative

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

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











Meridian Bioscience Europe France
34 rue de Ponthieu - 75008 Paris
FRANCE
Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40
Fax: +33 (0) 67 89 59 58
Email: info.fr@meridianbioscience.eu

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

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

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

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guía de símbolos, Zeichenerklärung)

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

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