

EBV VCA-IgM-ELA Test PKS medac

Deutsch/English/Français



HERSTELLER/MANUFACTURER/FABRICANT

medac
Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Fehlandtstraße 3
D-20354 Hamburg

VERTRIEB/MARKETING/DISTRIBUTION

medac
Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Geschäftseinheit Diagnostika
Theaterstraße 6
D-22880 Wedel

Tel./Phone: ++49 / 4103 / 80 06-351
Fax: ++49 / 4103 / 80 06-359

**BESTELLADRESSE/ORDERING ADDRESS/
ADRESSE DE COMMANDE**

Tel./Phone: ++49 / 4103 / 80 06-111
Fax: ++49 / 4103 / 80 06-113

Deutsch: S. 1
English: p. 12
Français: p. 23

Literatur/References/Littérature: S./p./p. 34

EBV VCA-IgM-ELA Test PKS medac

Enzymimmunoassay mit **Pipettier-Kontroll-System (PKS)** zur Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen das Epstein-Barr-Virus-spezifische Kapsidantigen (VCA) in Serum

Katalog-Nr.: 127-PKS

ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

EINFÜHRUNG

Das *Epstein-Barr-Virus* (EBV) gehört zur Familie der *Herpesviridae*. Es besteht aus einem doppelsträngigen DNA-Genom, einem Kapsid, dem Tegument sowie der Virushülle. Typisch für EBV ist, dass sie nach einer Primärinfektion lebenslang latent im Organismus verbleiben.

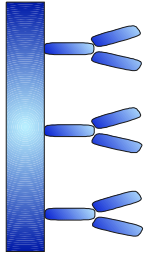
Weltweit sind 90 - 95 % aller erwachsenen Personen mit EBV infiziert. Bei immunkompetenten Personen verlaufen EBV-Primärinfektionen meist asymptomatisch im frühen Kindesalter. Bei jungen Erwachsenen manifestiert sich eine EBV-Infektion klinisch als infektiöse Mononukleose (Pfeiffer'sches Drüsenfieber). Bereits bei geringfügiger Immunsuppression kann es zu einer klinisch meist stummen Reaktivierung des Virus kommen. Unter massiver Immunsuppression können sich EBV-assoziierte, polyklonale B-Zell-Lymphome entwickeln. Bei 60 % aller Hodgkin-Lymphome findet man EBV-DNA. Endemisch relevante, mit EBV in Verbindung stehende Tumorerkrankungen sind das Burkitt-Lymphom und das Nasopharynx-Karzinom.

Für die Antikörperdiagnostik wichtige Antigenkomplexe sind das EBV-spezifische Kernantigen (EBNA), das Virus-Kapsid-Antigen (VCA) und das Early Antigen (EA).

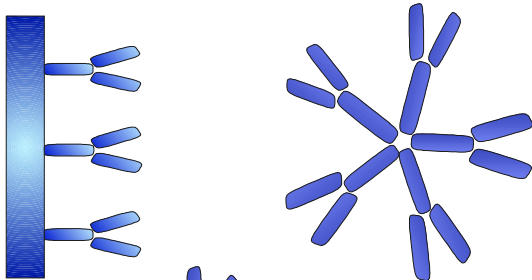
In der EBV-Diagnostik bei Immungesunden steht die Antikörperdiagnostik zur Differenzierung von Primärinfektion gegenüber zurückliegenden Infektionen und Seronegativität im Vordergrund. Die EBV-Serologie kann als ergänzende Diagnostik bei Lymphadenopathien und unklaren neurologischen Erkrankungen von Bedeutung sein. Im Rahmen einer sinnvollen serologischen EBV-Stufendiagnostik, steht die EBNA-1-IgG-Bestimmung an erster Stelle. Ein positives Ergebnis bestätigt eine zurückliegende Infektion. Bei negativem EBNA-1-IgG muß eine Differenzierung über die Bestimmung von VCA-IgG und -IgM erfolgen.

Der EBV VCA-IgM-ELA Test PKS medac detektiert IgM-Antikörper, die spezifisch gegen das Viruskapsidprotein gp 125 gerichtet sind. Der Test ist schnell und einfach durchzuführen. Die Verwendung des μ -capture- und ELA-Prinzips ermöglicht eine hochspezifische und sensitive diagnostische Aussage.

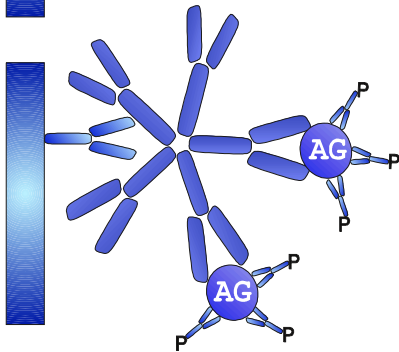
TESTPRINZIP



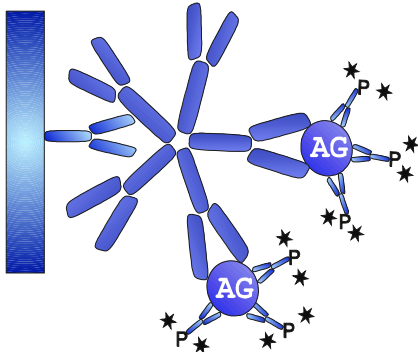
Mit Anti-Human-IgM beschichtete Mikrotiterplatte.



Die IgM-Fraktion aus dem Patientenserum wird auf der Mikrotiterplatte gebunden.



Der Komplex aus mAk-Peroxidase-Konjugat und VCA gp 125-Antigen bindet spezifisch an die Anti-VCA-IgM-Antikörper (AG = Antigen, P = Peroxidase).



Inkubation mit TMB-Substrat (*). Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure. Die Auswertung erfolgt photometrisch.

Testvorteile

- ☞ Keine unspezifischen Reaktionen und falsch positiven Ergebnisse durch Rheumafaktoren.
- ☞ Keine Blockade der IgM-Antikörper durch hohe IgG-Titer.
- ☞ Durch das Pipettier-Kontroll-System kann jeder einzelne Pipettierschritt durch Farbumschlag visuell überprüft werden.
- ☞ Die brechbaren Mikrotiterstreifen gewährleisten eine optimale Testauslastung.
- ☞ Automatisierbar auf offenen ELISA-Gerätesystemen.

PACKUNGSINHALT

KAT.-NR.: 127-PKS

1.

MTP

Mikrotiterplatte: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen (mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt), brechbar, Rundboden, beschichtet mit Ziege-Anti-Human-IgM-Antikörpern, BSA und pH-Indikator, gebrauchsfertig.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Negative Kontrolle: 2 Fläschchen à 0,75 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Positive Kontrolle: 2 Fläschchen à 0,75 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält FKS, BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
4.

WB

Waschpuffer: 1 Flasche à 100 ml, PBS/Tween (10 x), pH 7,2 - 7,4, enthält ProClin™ 300.
5.

VIR-DIL

Probenverdünnungspuffer: 1 Flasche à 110 ml, PBS/Tween/BSA, pH 7,2 - 7,4, gebrauchsfertig, enthält ProClin™ 300.
6.

ANTIGEN-DIL

Antigenverdünnungspuffer: 1 Fläschchen à 14 ml Tris/NaCl, gebrauchsfertig, enthält ProClin™ 300.
7.

ANTIGEN

Antigen: 4 Fläschchen à 3,0 ml, EBV VCA gp 125-Antigen/BSA, lyophilisiert.
8.

CON

Konjugat: 1 Fläschchen à 0,3 ml, Anti-VCA gp 125-IgG-Antikörper, monoclonal (Maus), HRP-konjugiert, gebrauchsfertig, rot gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
9.

TMB

TMB-Substrat: 1 Fläschchen à 10 ml, gebrauchsfertig.
10.

STOP

Stopplösung: 2 Fläschchen à 14 ml, 0,5 M Schwefelsäure (H₂SO₄), gebrauchsfertig.

1. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Material/Reagenz	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Testkit	ungeöffnet	2...8 °C	bis Verfalldatum
Mikrotiterplatte	geöffnet	2...8 °C im Beutel mit Trockenmittelpappe	6 Wochen
Kontrollen	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Waschpuffer	verdünnt	2...8 °C	6 Wochen
Probenverdünnungs- puffer	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Antigenverdünnungs- puffer	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Konjugat	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Antigen-Konjugat- Mischung	gebrauchs- fertig	2...8 °C ≤ -18 °C *	3 Tage 6 Wochen
TMB-Substrat	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Stopplösung	geöffnet	2...8 °C	bis Verfalldatum

* Aliquotieren und nach dem Auftauen nicht wieder einfrieren!

Die Reagenzien sind nach Ablauf des angegebenen Verfalldatums nicht mehr zu verwenden.

2. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- 2.1. Aqua ad iniectabilia (H₂O bidest.). Die Verwendung von entionisiertem Wasser kann zu Störungen im Testsystem führen.
- 2.2. Mikroliterpipetten für entsprechende Volumina.
- 2.3. Saubere Glas- oder Kunststoffgefäße zum Verdünnen von Waschpuffer und Proben.
- 2.4. Geeignete Vorrichtung zum Waschen der Mikrotiterplatte (z. B. Multistepper oder ELISA-Waschgerät).
- 2.5. Inkubator für 37 °C.
- 2.6. Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern für 450 nm und 620 - 650 nm.

3. ANSETZEN DER REAGENZIEN

Alle Kitkomponenten müssen vor Testansatz auf Raumtemperatur gebracht werden.

Ermitteln Sie die Anzahl der benötigten Mikrotitervertiefungen.

3.1. Mikrotiterplatte

Der Aluminiumbeutel muß nach jeder Entnahme zusammen mit der Trockenmittelpappe wieder fest verschlossen werden. Lagerung und Haltbarkeit der nicht verwendeten Mikrotitervertiefungen siehe unter 1.

Hinweis: Die Mikrotitervertiefungen weisen einen leicht grünlichen Farbton auf. Ggf. auftretende grünlich-braune Flecken in den Vertiefungen sind produktionsbedingt und stören den Test nicht.

3.2. Waschpuffer

1 Teil Waschpuffer (10 x) wird mit 9 Teilen Aqua ad iniectabilia angesetzt (z. B. 50 ml Waschpuffer (10 x) mit 450 ml Aqua ad iniectabilia). Für acht Vertiefungen werden 10 ml Waschpuffer benötigt.

Evtl. im Waschpuffer (10 x) vorhandene Kristalle sind vor dem Ansetzen durch Erwärmen (max. 37 °C) und/oder Rühren bei RT in Lösung zu bringen.

3.3. Antigen-Konjugat-Mischung

Das lyophilisierte Antigen wird mit jeweils 3,0 ml **Antigenverdünnungspuffer** aufgelöst. Die verschlossenen Fläschchen werden leicht geschwenkt, so daß auch am Verschuß haftende Partikel in Lösung gebracht werden. 60 min vor Gebrauch werden 50 µl Konjugat zu 3,0 ml Antigen pipettiert.

Nach dem Auflösen und der Zugabe des Konjugats ist die Antigen-Konjugat-Mischung rot gefärbt und gebrauchsfertig.

Die gebrauchsfertige Antigen-Konjugat-Mischung ist 3 Tage bei 2 - 8 °C bzw. 6 Wochen bei \leq -18 °C lagerfähig (s. 1.)!

Die testspezifischen Reagenzien (Mikrotiterplatte, Kontrollen, Konjugat, Antigen, Antigenverdünnungspuffer) sind nicht mit denen anderer Chargen zu mischen.

Im Gegensatz dazu sind Probenverdünnungspuffer, Waschpuffer, TMB-Substrat und Stopplösung für alle virologischen Tests von medac grundsätzlich austauschbar.

Reagenzien anderer Hersteller sind generell nicht einzusetzen.

Nur bei exakter Einhaltung der Arbeitsvorschrift werden valide und reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

4. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

- 4.1. Der Test ist geeignet zur Untersuchung von Serum.
- 4.2. Eine Vorbehandlung der Seren, wie z. B. Inaktivierung, ist nicht erforderlich, sie sollten jedoch nicht mikrobiell kontaminiert und frei von Humanerythrocyten sein.
- 4.3. Die Seren werden 1 : 100 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. Zur Titer-Bestimmung können die Proben beliebig weiterverdünnt werden.

5.A. ARBEITSVORSCHRIFT

- 5.1. Die Verpackung der Mikrotiterplatte am ZIP-Verschluß öffnen und die erforderliche Anzahl Mikrotitervertiefungen entnehmen (s. 3.1.).

Die Mikrotitervertiefungen sind gebrauchsfertig und müssen nicht vorgewaschen werden.

- 5.2. Die Vertiefung A1 bleibt frei für die Ermittlung des Leerwertes (s. 6.A.). Jeweils 50 µl der Proben sowie in Doppelbestimmung negative Kontrolle und positive Kontrolle in die Vertiefungen der Platte pipettieren.

Nach dem Pipettieren der Proben (pH-neutrale bzw. basische Flüssigkeiten) kommt es zu einer Blau-/Grünfärbung. Erfolgt in einer Vertiefung kein Farbumschlag, so ist dies ein Hinweis darauf, daß keine Probe bzw. keine Kontrolle pipettiert wurde.

Ggf. kann die Platte bis zur weiteren Bearbeitung in einer feuchten Kammer für maximal 30 min bei RT gelagert werden.

- 5.3. Die Mikrotitervertiefungen 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.4. Ansetzen der Antigen-Konjugat-Mischung (s. 3.3.).
- 5.5. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen dreimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer waschen. Darauf achten, daß alle Vertiefungen beim Waschen gefüllt werden. Nach Beendigung des Waschvorganges Mikrotitervertiefungen auf Filterpapier ausklopfen.

Nicht austrocknen lassen! Umgehend weiterverwenden!

- 5.6. Antigen-Konjugat-Mischung (rot gefärbt) in alle Vertiefungen (außer A1) pipettieren.

Beim manuellen Abarbeiten des Tests werden 50 µl Antigen-Konjugat-Mischung pro Vertiefung pipettiert.

Bitte beachten:

Beim Arbeiten mit automatisierten Gerätesystemen ist auf Grund der höheren Verdunstung in den Inkubationskammern die Zugabe von 60 µl Antigen-Konjugat-Mischung pro Vertiefung zu programmieren.

Die grundsätzliche Eignung des Tests für die automatisierte Abarbeitung konnte im Rahmen der Validierung gezeigt werden. Dennoch empfehlen wir, die Kompatibilität mit dem zum Einsatz kommenden Gerätesystem zu verifizieren.

- 5.7. Erneut 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.8. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen erneut waschen (s. 5.5.).
- 5.9. 50 µl TMB-Substrat in jede Vertiefung (auch A1) pipettieren und 30 min (\pm 2 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) im Dunkeln inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt). Positive Proben erscheinen blau gefärbt.
- 5.10. Durch Zugabe von 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung (auch A1) wird die Reaktion gestoppt. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb.

Mikrotitervertiefungen vor photometrischer Messung von unten abwischen und darauf achten, daß keine Luftblasen in den Vertiefungen vorhanden sind!

Die Messung ist innerhalb von 15 min nach dem Stoppen durchzuführen!

5.B. TABELLE ZUR ARBEITSVORSCHRIFT

	Leerwert (A1)	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle	Probe
Negative Kontrolle	-	50 µl	-	-
Positive Kontrolle	-	-	50 µl	-
Probe	-	-	-	50 µl
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 µl Waschpuffer waschen				
Antigen-Konjugat- Mischung	-	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 µl Waschpuffer waschen				
TMB-Substrat	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren				
Stopplösung	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometrische Auswertung bei 450 nm (Ref. 620-650 nm)				

*) manuelle/automatisierte Abarbeitung (s. 5.6.)

6.A. TESTBEURTEILUNG (VALIDITÄT)

- * Die photometrische Auswertung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620 - 650 nm).
- * Die OD des Leerwertes (Vertiefung A1) wird von allen OD-Werten subtrahiert.
- * Der OD-Mittelwert der **negativen Kontrolle** muß < **0,100** betragen.
Der OD-Mittelwert der **positiven Kontrolle** muß > **0,800** betragen.
- * **Cut-off = OD-Mittelwert der negativen Kontrolle + 0,140**
- * **Grenzbereich = Cut-off ± 10 %**

6.B. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE/GRENZEN DER METHODE

- * Proben mit Unit-Werten unterhalb des Grenzbereiches werden als **NEGATIV** bewertet.
- * Proben mit Unit-Werten innerhalb des Grenzbereiches werden als **GRENZWERTIG** bewertet.
Diese Werte sollten kontrolliert werden, indem nach 14 Tagen eine zusätzliche Patientenprobe entnommen wird, die zusammen mit der ersten Probe auf eine Titerbewegung untersucht wird.
- * Proben mit Unit-Werten oberhalb des Grenzbereiches werden als **POSITIV** bewertet.
- * Die Testergebnisse sollten stets im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der Patienten sowie den EBNA-1-IgG-, den VCA-IgG-Ergebnissen und ggf. weiteren diagnostischen Parametern interpretiert werden.
- * Kreuzreaktivitäten, die durch Antikörper gegen andere Herpesviren hervorgerufen werden, können in Einzelfällen nicht ausgeschlossen werden.
- * Ein Einfluß sehr stark erhöhter Lipidwerte auf die gemessenen Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden.

6.C. DIAGNOSTISCHE INTERPRETATION DER EBV-SEROLOGIE MIT MEDAC-ASSAYS

Die nachfolgende Interpretation der Testergebnisse in Bezug auf den Infektionsstatus gilt für die Untersuchung immunkompetenter Probanden.

EBNA-1-IgG	VCA-IgG	VCA-IgM	Interpretation
-	-	-	seronegativ
+	+/-/-	-	zurückliegende Infektion
-	+/-/-	+	Primärinfektion

Alle anderen Befundkonstellationen sind als unklar zu interpretieren. Im Falle eines unklaren Ergebnisses ist eine erweiterte Differenzialdiagnostik erforderlich.

Um die Anzahl unklarer Befundkonstellationen zu minimieren, empfehlen wir den gemeinsamen Einsatz der aufeinander abgestimmten EBV-ELISA von medac.

7. LEISTUNGSMERKMALE

Die nachfolgenden Leistungsmerkmale wurden von uns im Rahmen der diagnostischen Evaluierung ermittelt.

7.A. SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Im Rahmen der diagnostischen Erprobung wurden 352 Proben im Vergleich zur diagnostischen Bewertung aus dem Labor Frau Prof. Enders und Kollegen, Stuttgart und dem Institut für Virologie der Universität Homburg/Saar, gemessen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Neun-Felder-Tafel dargestellt:

		Vorbefund (IFT)		
		negativ	grenzwertig	positiv
EBV VCA-IgM-ELA Test PKS medac	negativ	237	0	11
	grenzwertig	1	0	1
	positiv	1	0	101

Sensitivität = 89,4 %

Spezifität = 99,2 %

Übereinstimmung: 96 %

7.B. PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz			
	MW OD	S	VK (%)	n		MW OD	S	VK (%)	n
NK	0,069	0,012	17	23	NK	0,070	0,010	14	12
GW	0,456	0,013	3	23	GW	0,441	0,019	4	12
PK	1,361	0,030	2	23	PK	1,282	0,057	4	12
Nr. 1	0,050	0,005	10	23	Nr. 4	0,076	0,010	13	12
Nr. 2	0,839	0,029	4	23	Nr. 5	0,392	0,037	9	12
Nr. 3	1,981	0,033	2	23	Nr. 6	0,769	0,046	6	12
					Nr. 7	1,160	0,051	4	12
					Nr. 8	1,884	0,064	3	12

NK = negative Kontrolle; GW = schwach positive Kontrolle (nicht im Kit enthalten);
PK = positive Kontrolle

ALLGEMEINE HANDHABUNGSHINWEISE

- * Reagenzienflaschen und deren Verschlüsse nicht vertauschen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- * Sofort nach Gebrauch die Reagenzflaschen wieder fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- * Nach Gebrauch sind die Reagenzien sofort wieder, entsprechend den vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen, zu lagern, um die angegebene Haltbarkeit zu gewährleisten.
- * Um Verwechslungen mit Reagenzien anderer Testsysteme oder Chargen zu vermeiden, sollten alle Kitkomponenten einer Testpackung nach dem Gebrauch zusammen in der Originalpackung gelagert werden (siehe auch 3.).

SICHERHEITSHINWEISE

- * Die national verbindlichen Arbeitsschutzvorschriften sind zu beachten.
- * Die Reagenzien humanen Ursprungs wurden auf HBsAg, Anti-HIV 1/2 und Anti-HCV untersucht und für nicht reaktiv befunden. Dennoch sollten diese Reagenzien wie auch jene, die Bestandteile tierischer Herkunft enthalten (siehe Packungsinhalt), als potentiell infektiös behandelt werden, um das Risiko einer Ansteckung zu vermeiden.

ENTSORGUNGSHINWEISE

Die in diesem Produkt enthaltenen Chemikalien und Zubereitungen sowie die bei der Anwendung dieses Produktes anfallenden Reste sind in der Regel Abfälle, die einer ordnungsgemäßen Entsorgung zugeführt werden müssen.

Die Entsorgung solcher Abfälle unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde oder Abfallentsorgungsunternehmen informieren über die Entsorgungsmöglichkeiten.

Ausgabedatum: 18.12.2006

EBV VCA-IgM-ELA Test PKS medac

Enzyme immunoassay with Pipetting Control System for the detection of IgM antibodies to Epstein-Barr virus specific capsid antigen (VCA) in serum

Cat. no.: 127-PKS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

INTRODUCTION

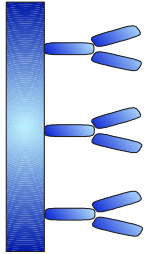
Epstein-Barr virus (EBV) belongs to the family of *Herpesviridae*. It consists of a double-stranded DNA genome, capsid, tegument and envelope. It is characteristic for EBV to persist latently and livelong in the organism after primary infection.

90 to 95 % of all adult individuals are infected with EBV worldwide. The course, EBV primary infections take in immunocompetent individuals in early childhood, is normally without any symptoms. In young adults an EBV infection clinically manifests as glandular fever (Pfeiffer's disease). In individuals who suffer from minor immunosuppression a clinically silent reactivation of the virus may occur. In individuals who suffer from massive immunosuppression EBV associated polyclonal B-cell lymphomas are observed. In 60 % of all Hodgkin lymphomas EBV-DNA is present. Endemically relevant EBV-associated tumor disease are Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma.

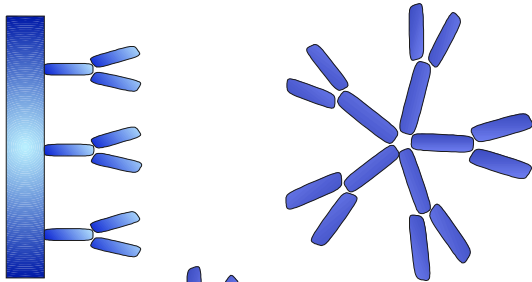
Relevant antigen complexes for antibody detection are the EBV-specific nuclear antigen (EBNA), the virus capsid antigen (VCA) and the early antigen (EA). In immunocompetent individuals antibody detection for distinction of primary infection towards previous infection or seronegativity is the focus of EBV diagnosis. EBV serology may be of importance as additional diagnostic of lymphadenopathy and of unclear neurological disease. In the context with a relevant EBV serology EBNA-1-IgG determination is the first step. A positive result confirms a previous infection. In the case of a negative EBNA-1-IgG, the determination of VCA-IgG and -IgM is essential to differentiate the status of infection.

The EBV VCA-IgM-ELA Test PKS medac detects IgM antibodies specifically directed against the virus capsid protein gp 125. The test can be carried out fast and easily. The μ -capture- and ELA-principle allow a highly specific and sensitive diagnostic interpretation.

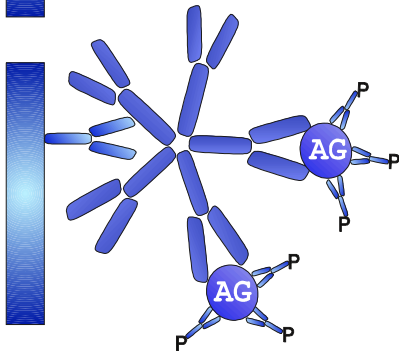
TEST PRINCIPLE



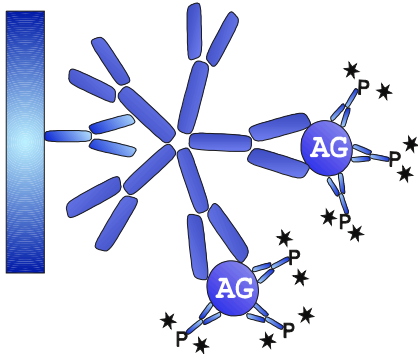
The plate is coated with anti-human IgM immunoglobulin.



IgM of the specimen is selectively bound to the wells.



The complex of mAb-peroxidase-conjugate and VCA gp 125 antigen binds to anti-VCA-IgM specific antibodies (AG = antigen, P = peroxidase).



Incubation with TMB-substrate (*). The reaction is stopped by the addition of sulfuric acid. The absorption is read photometrically.

Advantages of the test

- ☞ No unspecific reactions and no false positive results caused by rheumatoid factors.
- ☞ No blocking of IgM antibodies by high IgG titer.
- ☞ The Pipetting Control System allows to monitor visually each pipetting step through colour changes.
- ☞ The breakable microwell strips permit efficient use of the test.
- ☞ Suitable for automation on open ELISA devices.

KIT CONTENTS

Cat. no.: 127-PKS

1.

MTP

Microplate: 12 x 8 wells (with frame and desiccant vacuum sealed in aluminium bag), breakable, U-form, coated with goat anti-human IgM immunoglobulin, BSA and pH indicator, ready to use.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Negative control: 2 vials with 0.75 ml each, human serum, ready to use, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Positive control: 2 vials with 0.75 ml each, human serum, ready to use, contains FCS, BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
4.

WB

Wash buffer: 1 bottle with 100 ml, PBS/Tween (10 x), pH 7.2 - 7.4, contains ProClin™ 300.
5.

VIR-DIL

Sample diluent: 1 bottle with 110 ml, PBS/Tween/BSA, pH 7.2 - 7.4, ready to use, contains ProClin™ 300.
6.

ANTIGEN-DIL

Antigen diluent: 1 vial with 14 ml Tris/NaCl, ready to use, contains ProClin™ 300.
7.

ANTIGEN

Antigen: 4 vials with 3.0 ml each, EBV VCA gp 125 antigen/BSA, lyophilised.
8.

CON

Conjugate: 1 vials with 0.3 ml, anti VCA gp 125-IgG antibodies, monoclonal (mouse), HRP-conjugated, ready to use, stained red, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
9.

TMB

TMB-substrate: 1 vial with 10 ml, ready to use.
10.

STOP

Stop solution: 2 vials with 14 ml each, 0.5 M sulfuric acid (H₂SO₄), ready to use.

1. STORAGE AND STABILITY

MATERIAL/REAGENT	STATE	STORAGE	STABILITY
Test kit	unopened	2...8°C	until expiry date
Microplate	opened	2...8°C in bag with desiccant	6 weeks
Controls	opened	2...8°C	6 weeks
Wash buffer	diluted	2...8°C	6 weeks
Sample diluent	opened	2...8°C	6 weeks
Antigen diluent	opened	2...8°C	6 weeks
Conjugate	opened	2...8°C	6 weeks
Antigen-conjugate mixture	ready to use	2...8°C	3 days
		≤ -18 °C *	6 weeks
TMB-substrate	opened	2...8°C	6 weeks
Stop solution	opened	2...8°C	until expiry date

* Aliquote and do not freeze again after thawed once!

Do not use the reagents after the expiry date.

2. REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 2.1. Water for injection (H₂O redist.). Use of deionised water can disturb the test procedure.
- 2.2. Adjustable micropipettes.
- 2.3. Clean glass or plastic containers for dilution of wash buffer and specimen.
- 2.4. Suitable device for microplate washing (e.g. multistepper or ELISA washer).
- 2.5. Incubator for 37 °C.
- 2.6. Microplate reader with filters for 450 nm and 620 - 650 nm.

3. PREPARATION OF THE REAGENTS

Before starting the test procedure all kit components must be equilibrated to room temperature.

Calculate the number of wells required.

3.1. Microplate

The aluminium bag has to be tightly resealed together with the desiccant after each removal of wells. Storage and stability of the wells are indicated below point 1.

Note: The microplate wells have a light green colour. Possibly occurring greenish brown stains inside the wells are due to the production process and do not influence the test performance.

3.2. Wash buffer

Mix one volume of wash buffer (10 x) with nine volumes of water for injection (e.g. 50 ml wash buffer (10 x) with 450 ml water). 10 ml of diluted wash buffer are needed for eight wells.

Crystals in the wash buffer (10 x) have to be dissolved by warming (max. 37 °C) and/or stirring at RT.

3.3. Antigen-conjugate mixture

Reconstitute the lyophilised antigen with 3.0 ml **antigen diluent** each. Mix gently and take care that particles sticking to the closure are also dissolved. Add 50 µl conjugate to 3.0 ml antigen 60 min before use.

After reconstitution of the antigen and addition of the conjugate, the antigen-conjugate mixture has a red colour and is ready to use.

The ready-to-use antigen-conjugate mixture can be stored at 2 - 8 °C for three days or at \leq -18 °C for 6 weeks (see 1.)!

Do not mix test specific reagents (microplate, controls, conjugate, antigen, antigen diluent) from different kit lots.

In contrast to that sample diluent, wash buffer, TMB-substrate and stop solution are generally exchangeable in all virological ELISA medac.

Reagents from other manufacturers must not be used in general.

Valid and reproducible results are only obtained if the test procedure is precisely followed.

4. SPECIMEN

- 4.1. The test is suitable for serum.
- 4.2. Pretreatment of sera, e.g. inactivation, is not necessary. However, they should neither be contaminated with microorganisms nor contain any red blood cells.
- 4.3. Sera have to be diluted 1 : 100 with sample diluent. They can be diluted further for titer determination.

5.A. TEST PROCEDURE

- 5.1. Cut the aluminium bag above the zip fastener and take out the required number of microplate wells (see 3.1.).

Microplate wells are ready to use and do not have to be pre-washed.

- 5.2. Leave well A1 empty as blank (see 6.A.). Add 50 µl each of the diluted sample as well as negative control and positive control in duplicates to the wells.

After pipetting the samples (pH neutral or basic fluid) the wells turn blue/green. A missing colour change in one well indicates that no sample or control has been added.

If necessary, the microplate wells can be kept in a humid chamber up to 30 min at RT before proceeding.

- 5.3. Incubate the microplate wells for 60 min (\pm 5 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.
- 5.4. Prepare the antigen-conjugate-mixture (see 3.3.).
- 5.5. After incubation wash the microplate wells three times with 200 µl wash buffer per well. Pay attention that all wells are filled. After washing tap microplate wells on filter paper.

Do not allow the wells to dry out! Proceed immediately!

5.6. Add antigen-conjugate-mixture (coloured red) to each well (except A1).

50 µl of antigen-conjugate-mixture have to be pipetted into the wells if the test is done manually.

Please note:

When working with automated devices, 60 µl of antigen-conjugate-mixture have to be pipetted into each well due to a higher evaporation in the incubation chambers of the devices.

The suitability of the test for automated devices was confirmed during the evaluation of the test. Nevertheless we recommend to verify the compatibility of the test with the devices used in the lab.

5.7. Incubate again for 60 min (\pm 5 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.

5.8. After incubation wash microplate wells again (see 5.5.).

5.9. Add 50 µl of TMB-substrate to each well (also A1) and incubate for 30 min (\pm 2 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil in the dark. Positive samples turn blue.

5.10. Stop the reaction by adding 100 µl of stop solution to each well (also A1). Positive samples turn yellow.

Clean microplate wells from underneath before the photometric reading and take care that there are no air bubbles in the wells.

The reading should be done within 15 min after adding the stop solution!

5.B. TABLE FOR THE TEST PROCEDURE

	Blank (A1)	Negative control	Positive control	Sample
Negative control	-	50 µl	-	-
Positive control	-	-	50	-
Sample	-	-	-	50 µl
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 µl wash buffer				
Antigen-conjugate mixture	-	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 µl wash buffer				
TMB-substrate	50 µl	50 µl	50 µl	50
Incubate for 30 minutes at 37 °C in the dark				
Stop solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometric reading at 450 nm (ref. 620-650 nm)				

*) manual/automatic procedure (see 5.6.)

6.A. CALCULATION OF RESULTS (VALIDITY)

- * Read OD values at 450 nm (reference wavelength 620-650 nm).
- * Subtract the OD value of the blank (well A1) from all other OD values.
- * The mean OD value of the **negative control** has to be **< 0.100**.
The mean OD value of the **positive control** has to be **> 0.800**.
- * **Cut-off = mean OD value of the negative control + 0.140**
- * **Grey zone = Cut-off ± 10 %**

6.B. INTERPRETATION OF RESULTS/LIMITATIONS OF THE METHOD

- * Samples with Unit values below the lower limit of the grey zone are reported as **NEGATIVE**.
- * Samples with Unit values within the grey zone are reported as **EQUIVOCAL**.

These samples should be retested together with a fresh specimen taken 14 days later in order to determine a titer change.
- * Samples with Unit values exceeding the upper limit of the grey zone are reported as **POSITIVE**.
- * The results should always be interpreted in connection with clinical data of the patients as well as the EBNA-1 IgG, the VCA IgG results and additional diagnostic parameters.
- * Cross reactions, caused by antibodies against other Herpesviridae, cannot be excluded in single cases.
- * An influence of very high lipid concentration cannot be excluded.

6.C. DIAGNOSTIC INTERPRETATION OF EBV-SEROLOGY WITH MEDAC ASSAYS

The following interpretation of test results regarding the status of infection is only valid for the investigation of immunocompetent individuals.

EBNA-1-IgG	VCA-IgG	VCA-IgM	Interpretation
-	-	-	seronegative
+	+/-/-	-	past infection
-	+/-/-	+	primary infection

All other constellations have to be interpreted as unclear. In the event of an unclear result extended differential diagnostic methods would be necessary for interpretation.

In order to reduce the number of ambiguous constellations we recommend the application of medac's EBV-ELISA panel.

7. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

We determined the following performance characteristics during the diagnostic evaluation.

7.A. SENSITIVITY AND SPECIFICITY

352 sera were measured during the diagnostic evaluation. The results were correlated with the diagnostical characterization of the lab Prof. Dr. Enders and Colleagues, Stuttgart and the Institute of Virology of the University Homburg/Saar. The results are shown in the table below:

		Pre-definition (IFA)		
		negative	cut-off	positive
EBV VCA-IgM-ELA Test PKS medac	negative	237	0	11
	cut-off	1	0	1
	positive	1	0	101

Sensitivity = 89.4 %
 Specificity = 99.2 %

Concordance: 96 %

7.B. PRECISION

Sample	Intra-assay variation				Sample	Interassay variation			
	mean OD	SD	CV (%)	n		mean OD	SD	CV (%)	n
NC	0.069	0.012	17	23	NC	0.070	0.010	14	12
BC	0.456	0.013	3	23	BC	0.441	0.019	4	12
PC	1.361	0.030	2	23	PC	1.282	0.057	4	12
N° 1	0.050	0.005	10	23	N°4	0.076	0.010	13	12
N° 2	0.839	0.029	4	23	N°5	0.392	0.037	9	12
N° 3	1.981	0.033	2	23	N°6	0.769	0.046	6	12
					N°7	1.160	0.051	4	12
					N°8	1.884	0.064	3	12

NC = negative control; BC = weak positive control (not included in the kit);
 PC = positive control

GENERAL HANDLING ADVICES

- * To avoid cross contamination do not exchange the vials and their screw caps.
- * The reagents have to be sealed immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- * After use, the reagents have to be stored as indicated to guarantee the shelf life.
- * After use, all components of the testkit should be stored in the original package, in order to avoid mixing up the reagents of other test systems or lots (see also 3.).

HEALTH AND SAFETY INFORMATION

- * The local occupational safety and health regulations have to be regarded.
- * Reagents of human origin have been tested and found to be negative for HBsAg, for antibodies to HIV-1/2 and to HCV. Nevertheless, it is strongly recommended that these materials as well as those of animal origin (see kit contents), should be handled as potentially infectious and used with all necessary precautions.

DISPOSAL CONSIDERATIONS

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

Date of issue: 18.12.2006

EBV VCA-IgM-ELA Test PKS medac

Immunoessai enzymatique avec Système de Contrôle de Pipettage pour la détection des anticorps IgM anti antigène spécifique de capsid du virus Epstein-Barr (VCA) dans le sérum.

Cat. no.: 127-PKS

DESTINE UNIQUEMENT AU DIAGNOSTIC IN VITRO

INTRODUCTION

Le virus Epstein-Barr (EBV) appartient à la famille des *Herpesviridae*. Il consiste en un génome à double brin d'ADN, capsid, tégument et enveloppe. Il est caractéristique pour l'EBV de persister de manière latente et pendant toute la vie dans l'organisme après une infection primaire.

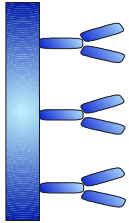
90 à 95 % de tous les individus adultes sont infectés par l'EBV dans le monde. L'évolution des infections primaires à EBV chez des individus immunocompétents lors de la prime enfance est normalement sans aucun symptôme. Chez les adultes jeunes, une infection à EBV se manifeste cliniquement par une mononucléose infectieuse (maladie de Pfeiffer). Chez les individus qui souffrent d'une immunosuppression mineure, une réactivation cliniquement silencieuse du virus peut apparaître. Chez les individus qui souffrent d'une immunosuppression importante associée aux cellules B polyclonales, peuvent être observés des lymphomes. Dans 60 % de tous les lymphomes de Hodgkin, de l'ADN-EBV est présent. Des maladies tumorales endémiques en rapport avec EBV sont le lymphome de Burkitt et le carcinome nasopharyngé.

Des complexes antigéniques significatifs pour la détection des anticorps sont l'antigène nucléaire spécifique de EBV (EBNA), l'antigène de capsid viral (VCA) et l'antigène précoce (EA).

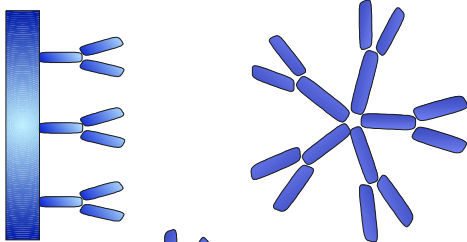
Chez les individus immunocompétents, la détection des anticorps pour distinguer une infection primaire d'une infection antérieure ou la séronégativité est le but du diagnostic de l'EBV. La sérologie à EBV peut être importante comme diagnostic complémentaire d'une lympho-adénopathie et d'une maladie neurologique indéterminée. Dans le contexte d'une sérologie EBV significative, la détermination de EBNA-1-IgG est la première étape. Un résultat positif confirme une infection antérieure. Dans le cas d'un résultat EBNA-1-IgG négatif, la détermination de VCA-IgG et -IgM est essentiel pour différencier le stade de l'infection.

Le kit EBV VCA-IgM-ELA Test PKS medac détecte les anticorps IgM dirigés de manière spécifique contre la protéine virale de capsid gp 125. Le test peut être réalisé rapidement et facilement. La μ -capture et le principe ELA permettent une interprétation diagnostique hautement spécifique et sensible.

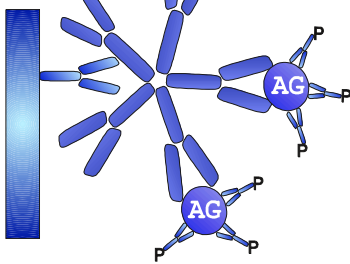
PRINCIPE DU TEST



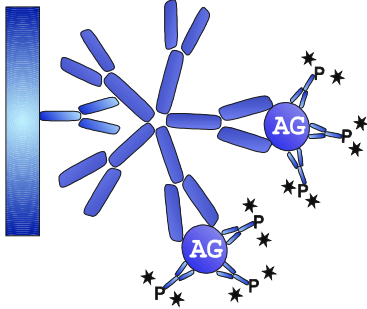
La plaque est coatée avec des immunoglobulines anti IgM humaines.



Les IgM des échantillons se lient spécifiquement aux anticorps fixés dans les cupules.



Le complexe de conjugué-mAc-peroxidase et de VCA gp 125 se lie aux anticorps spécifiques anti-VCA-IgM.
(AG = antigène, P = peroxidase)



Incubation avec TMB-substrat(*). La réaction est arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique. L'absorption est lue sur un spectrophotomètre.

Les avantages du test

- ☞ Aucune réaction non spécifiques due aux facteurs rhumatoïdes, évitant ainsi des résultats faussement positifs.
- ☞ Pas de blocage des anticorps IgM à cause de titres élevés d'IgG.
- ☞ Le système de contrôle de la distribution des réactifs (PCS) permet un contrôle visuel de toutes les étapes de dépôts des réactifs et d'échantillons, par un changement de couleur.
- ☞ La microplaque, sécable puits à puits, permet une utilisation optimisée du réactif.
- ☞ Automatisation possible sur systèmes EIA ouverts.

CONTENU DE LA TROUSSE

REF. : 127-PKS

1.

MTP

Microplaque: 12 x 8 puits en U (avec support et dessiccateur, dans un sachet d'aluminium sous vide), sécables, recouverts d'immunoglobuline anti IgM humaine et de la BSA, présence d'un indicateur coloré dans les puits de réaction, prêts à l'emploi.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Contrôle négatif: 2 flacons de 0,75 ml chacun, contenant du sérum humain, prêt à l'emploi, contient de la BSA, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamicine.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Contrôle positif: 2 flacons de 0,75 ml chacun, contenant du sérum humain, prêt à l'emploi, contient de la BSA, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamicine.
4.

WB

Tampon de lavage: 1 flacon de 100 ml, contenant un tampon PBS/Tween (10 x), pH 7,2 - 7,4, contient du ProClin™ 300.
5.

VIR-DIL

Diluant pour échantillons: 1 flacon de 110 ml, contenant une solution tamponnée PBS/Tween/BSA, pH 7,2 - 7,4, prête à l'emploi, contient du ProClin™ 300.
6.

ANTIGEN-DIL

Diluant antigène: 1 flacon de 14 ml Tris/NaCl, prêt à l'emploi, contenant du ProClin™ 300.
7.

ANTIGEN

Antigène: 4 flacons de 3,0 ml chacun, EBV VCA gp 125 antigène/BSA, lyophilisé.
8.

CON

Conjugué: 1 flacon de 0,3 ml, anticorps anti VCA gp 125-IgG, monoclonal(souris), conjugué-HRP, prêt à l'emploi, coloré en rouge, contient de la BSA, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamicine.
9.

TMB

TMB-substrat: 1 flacon de 10 ml, prêt à l'emploi.
10.

STOP

Solution d'arrêt: 2 flacons de 14 ml chacun, contenant de l'acide sulfurique 0,5 M (H₂SO₄), prêt à l'emploi.

1. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

MATERIEL/REACTIF	ETAT	CONSERVATION	STABILITE
Trousse	non ouvert	2...8°C	Jusqu'à la date de péremption.
Microplaque	ouvert	2...8°C dans le sachet, avec déshydratant	6 semaines
Contrôles	ouvert	2...8°C	6 semaines
Tampon de lavage	dilué	2...8°C	6 semaines
Diluant pour échantillons	ouvert	2...8°C	6 semaines
Diluant antigène	ouvert	2...8°C	6 semaines
Conjugué	ouvert	2...8°C	6 semaines
Mélange antigène-conjugué	prêt à l'emploi	2...8°C	3 jours
		≤ -18 °C*	6 semaines
TMB-substrat	ouvert	2...8°C	6 semaines
Solution d'arrêt	ouvert	2...8°C	Jusqu'à la date de péremption

* Aliquoter et ne pas congeler à nouveau après la première décongélation !

Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.

2. REACTIFS ET MATERIELS NECESSAIRES MAIS NON FOURNI

2.1. Eau pour injection (bidistillée). L'utilisation d'eau désionisée peut perturber la procédure du test.

2.2. Micropipettes réglables.

2.3. Récipients propres en plastique ou en verre pour la dilution du tampon de lavage et des échantillons.

2.4. Dispositif de lavage des microplaques (par exemple multistepper ou ELISA washer).

2.5. Incubateur à 37 °C.

2.6. Lecteur de plaque avec filtres à 450 nm et 620 - 650 nm.

3. PREPARATION DES REACTIFS

Avant de démarrer la procédure de dosage, tous les composants de la trousse doivent être amenés à température ambiante.

Calculer le nombre de puits nécessaire.

3.1. Microplaque

Le sachet aluminium avec le dessiccant doit être soigneusement refermé après avoir retiré les puits. La conservation et la stabilité des puits sont indiqués au point 1.

Remarque: Les puits de la microplaque possèdent des reflets verts. Des aspects de couleur marrons verts peuvent être présents dans les puits, ceci est dû à la procédure de production et n'influencent pas les performances du test.

3.2. Tampon de lavage

Mélanger un volume de tampon de lavage (10 x) avec neuf volumes d'eau pour injection (par ex. 50 ml de tampon de lavage (10 x) avec 450 ml d'eau).

10 ml de tampon dilué sont nécessaires pour 8 puits.

Des cristaux dans le tampon de lavage (10 x) doivent être dissous en chauffant (max. 37 °C) et/ou en agitant, à température ambiante.

3.3. Mélange antigène-conjugué

Reconstituer l'antigène lyophilisé avec 3,0 ml de **diluant antigène**. Mélanger doucement et faire attention à ce que les particules qui adhèrent au bouchon soient aussi dissoutes. Ajouter 50 µl de conjugué à 3,0 ml d'antigène 60 min avant utilisation.

Après reconstitution de l'antigène et l' addition du conjugué, le mélange antigène-conjugué est de couleur rouge et est prêt à l'emploi.

Le mélange prêt à l'emploi antigène-conjugué peut être conservé à 2 - 8 °C pendant trois jours et à \leq -18 °C pendant 6 semaines (voir 1.)!

Ne pas mélanger les réactifs spécifiques du test (microplaque, contrôles, conjugué, antigène, diluant antigène) de différents lots. Par contre, le diluant pour échantillons, le tampon de lavage, le TMB-substrat et la solution d'arrêt sont interchangeables dans tous les tests virologiques ELISA de medac.

Des réactifs d'autres fabricants ne peuvent pas être utilisés.

Des résultats valides et reproductibles sont obtenus uniquement en suivant strictement la notice d'emploi.

4. ECHANTILLONS

- 4.1. Le test est à utiliser avec du sérum.
- 4.2. Un pré-traitement des échantillons, par ex: l'inactivation n'est pas nécessaire. Cependant, il ne peuvent pas être contaminés par des microorganismes ou contenir des globules rouges.
- 4.3. Les sérums sont à utiliser dilués au 1/100 avec le diluant échantillons. Ils peuvent être dilués davantage pour une éventuelle quantification.

5.A. MODE OPERATOIRE

- 5.1. Couper le sachet aluminium au-dessus de la fermeture à glissière et extraire le nombre de puits nécessaire (voir 3.1.).

Les puits sont prêts à l'emploi et ne doivent pas être prélevés.

- 5.2. Laisser la cupule A1 vide pour le blanc (voir 6.A.). Ajouter 50 µl de chaque échantillon dilué ainsi que 50 µl de contrôle négatif, 50 µl de contrôle positif en double dans les cupules.

Une couleur bleue/verte doit apparaître dans tous les puits (sauf pour le puits A1) après la distribution des échantillons (liquides pH neutre ou basique). L'absence d'un changement de couleur peut indiquer qu'aucun échantillon ou contrôle n'a été ajouté.

Si nécessaire, la microplaque peut, à ce stade de la technique, être conservée dans une chambre humide jusqu'à 30 min à température ambiante.

- 5.3. Incuber la microplaque pendant 60 min (\pm 5 min) à 37 °C (\pm 1 °C), dans une chambre humide ou la couvrir à l'aide d'un film pour incubation.
- 5.4. Préparer le mélange antigène-conjugué (voir 3.3.).
- 5.5. Après l'incubation, laver 3 fois la microplaque avec 200 µl de tampon de lavage par cupule. Faire attention à ce que toutes les cupules soient bien remplies. Après le lavage, tapoter la microplaque sur du papier absorbant.

Ne pas laisser sécher les puits ! Passer immédiatement à l'étape suivante.

5.6. Ajouter le mélange antigène-conjugué (coloré en rouge) à chaque puit (excepté A1).

50 µl de mélange antigène-conjugué sont à distribuer dans les cupules si le test est réalisé manuellement.

Remarque:

Quand le test est réalisé avec un automate de microplaque, 60 µl de mélange antigène-conjugué doivent être distribués dans chaque cupule à cause de l'évaporation importante dans les chambres d'incubation d'un appareil.

L'utilisation du test sur les appareils automatiques a été validée pendant l'évaluation du test. Néanmoins nous recommandons de vérifier la compatibilité du dosage avec les appareils utilisés dans le laboratoire.

5.7. Incuber à nouveau la plaque 60 min (± 5 min) à 37 °C (± 1 °C), dans une chambre humide ou couvrir la microplaque à l'aide d'un film pour incubation.

5.8. Après l'incubation, laver 3 fois la microplaque (voir 5.5.).

5.9. Ajouter 50 µl de TMB-substrat dans chaque cupule (aussi A1) et incuber 30 min (± 2 min) à 37 °C (± 1 °C) dans une chambre humide ou couvrir à l'aide d'un film pour incubation dans l'obscurité. Les échantillons positifs virent au bleu.

5.10. Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl de solution d'arrêt dans chaque cupule (également A1). Les échantillons positifs virent au jaune.

Essuyer soigneusement le dessous de la plaque avant la lecture photométrique et vérifier l'absence de bulles d'air dans les cupules.

La lecture doit être réalisée endéans les 15 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction.

5.B. TABLEAU DE DISTRIBUTION DES REACTIFS

	Blanc (A1)	Contrôle négatif	Contrôle positif	Echantillon
Contrôle neg.	-	50 µl	-	-
Contrôle pos.	-	-	50 µl	-
Echantillon	-	-	-	50 µl
Incuber 60 min à 37 °C, lavage 3 x avec 200 µl tampon de lavage				
Mélange antigène-conjugué	-	50/60 µl*)	50/60 µl*)	50/60 µl*)
Incuber 60 min à 37 °C, lavage 3 x avec 200 µl tampon de lavage				
TMB-substrat	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Incuber 30 min à 37 °C à l'obscurité				
Solution d'arrêt	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Lecture photométrique à 450 nm (ref. 620 - 650 nm)				

*) procédure manuel/automatique (voir 5.6.)

6.A. CALCUL DES RESULTATS (VALIDITE)

- * La lecture au spectrophotomètre est effectuée à une longueur d'onde de 450 nm (filtre de référence de 620 à 650 nm).
- * La valeur en D.O. du puit blanc réactif (puit A1) doit être soustraite de toutes les autres valeurs de D.O.
- * La valeur en D.O. du **contrôle négatif** doit être **< 0,100**
La valeur en D.O. du **contrôle positif** doit être **> 0,800**
- * **Valeur seuil (Cut-off) = Moyenne de la valeur de DO du contrôle négatif + 0,140**
- * **Zone grise : Cut-off ± 10 %**

6.B.INTERPRETATION DES RESULTATS/ LIMITES DE LA METHODE

- * Les échantillons ayant des valeurs en unités en dessous de la zone grise sont rendus **NEGATIFS**.
- * Les échantillons ayant des valeurs en unités dans la zone grise sont rendus **DOUTEUX**.

Ces échantillons sont à retester ensemble avec un deuxième prélèvement effectué 14 jours plus tard de manière à déterminer un changement de titre.
- * Les échantillons ayant des valeurs en unités dépassant la zone grise sont rendus **POSITIFS**.
- * Les résultats devraient toujours être interprétés par rapport aux données cliniques des patients comme l'EBNA-1 IgG, le VCA IgG et les paramètres complémentaires de diagnostic.
- * Des réactions croisées, causées par des anticorps contre d'autres Herpesviridae, ne peuvent être exclues dans de rares cas.
- * Une influence d'une concentration très élevée de lipides ne peut être exclue.

6.C. INTERPRETATION DIAGNOSTIQUE DE LA SEROLOGIE EBV AVEC LES TROUSSES

L'interprétation suivante des résultats des tests en rapport avec le stade d'infection est seulement valable pour des individus immunocompétents.

EBNA-1-IgG	VCA-IgG	VCA-IgM	Interprétation
-	-	-	Seronégatif
+	+ / ± / -	-	Infection ancienne
-	+ / ± / -	+	Infection primaire

Toutes les autres combinaisons doivent être interprétées comme peu claires. Dans le cas d'un résultat incertain un diagnostic différentiel étendu est nécessaire.

De manière à réduire le nombre de combinaisons ambiguës d'anticorps il est recommandé d'utiliser le panel EBV-ELISA medac.

7. CARACTERISTIQUES DES PERFORMANCES

Les performances suivantes ont été déterminées pendant l'évaluation diagnostique.

7.A. SENSIBILITE ET SPECIFICITE

352 séra ont été dosés pendant l'évaluation diagnostique. Les résultats ont été mis en corrélation avec la caractérisation diagnostique du laboratoire du Professeur Dr. Enders et Collègues, à Stuttgart et l'Institut de Virologie de l'Université de Homburg/Saar. Les résultats sont montrés dans le tableau ci-dessous :

Pré-définition (IFE)

		négatifs	limite	positifs
EBV VCA-IgM-ELA Test PKS medac	négatifs	237	0	11
	limite	1	0	1
	positifs	1	0	101

Sensibilité = 89,4 %

Spécificité = 99,2 %

Concordance: 96 %

7.B. PRECISION

Echan- tillon	Variation intra-essai				Echan- tillon	Variation interessai			
	moyenne OD	SD	CV (%)	n		moyenne OD	SD	CV (%)	n
CN	0,069	0,012	17	23	CN	0,070	0,010	14	12
FC	0,456	0,013	3	23	FC	0,441	0,019	4	12
CP	1,361	0,030	2	23	CP	1,282	0,057	4	12
N° 1	0,050	0,005	10	23	N°4	0,076	0,010	13	12
N° 2	0,839	0,029	4	23	N°5	0,392	0,037	9	12
N° 3	1,981	0,033	2	23	N°6	0,769	0,046	6	12
					N°7	1,160	0,051	4	12
					N°8	1,884	0,064	3	12

CN = contrôle négatif; FC = contrôle faiblement positif (pas inclus dans le kit);
CP = contrôle positif

INDICATIONS GENERALES

- * Ne pas échanger les flacons et leurs bouchons pour éviter les contaminations croisées.
- * Les flacons des réactifs doivent être refermés immédiatement après leur utilisation pour éviter l'évaporation et une contamination microbienne.
- * Après emploi, les réactifs doivent être conservés comme indiqué pour garantir leur conservation.
- * Après leur utilisation, conserver tous les composants de la trousse dans leur emballage d'origine, afin d'éviter le mélange des réactifs concernant d'autres techniques de dosage ou d'autres lots (voir aussi 3.).

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- * Il faut appliquer la réglementation en vigueur en matière de sécurité et de santé.
- * Les réactifs d'origine humaine ont été dosés et trouvés négatifs en AgHBs, en anticorps anti-HIV-1/2 et anti-VHC. Néanmoins, il est fortement conseillé de manipuler ces produits, ainsi que ceux d'origine animale (voir contenu de la trousse), comme étant potentiellement infectieux et de les utiliser avec les précautions nécessaires.

CONSEIL D'EVACUATION

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'évacuation de ce type de déchets doit se faire selon la réglementation en vigueur. Il faut consulter les organismes agréés pour connaître le moyen de se débarrasser de ces déchets.

Date de parution: 18.12.2006

LITERATUR/REFERENCES/LITTERATURE

Bauer, G.: Epstein-Barr-Virus - Bedeutung und Möglichkeiten der Labordiagnostik.

Therapeutische Umschau 51(8), 558-562, (1994).

Bauer, G.: The rational basis for efficient Epstein-Barr Virus (EBV) serology. Clin. Lab. 41(9), 623-634, (1995).

Hille, A., Klein, K., Baumler, S., Grasser, F.A., Mueller-Lantzsch, N.: Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1, 2A and 2B in the baculovirus expression system: serological evaluation of human antibodies to these proteins. J. Med. Virol. 39 (3), 233-241, (1993).

Linde, A.: Diagnosis of Epstein-Barr Virus - related diseases. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 100, 83-88, (1996).

Mertens, T., Haller, O., Klenk, H.-D. (Hrsg.): Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten. 65-70, Urban & Fischer Verlag, (2004).

Modrow, S., Falke, D. (Hrsg.): Molekulare Virologie. 454-460, Spektrum Akademischer Verlag, (1997).

Prang, N.S., Schwarzmann, F.: Aktuelle Perspektiven in der Diagnostik Epstein-Barr-Virus assoziierter Erkrankungen. Immun. Infekt. 4, 144-151, (1997).