

**VIROTECH EBV IgG/IgM ELISA
(EBV IgG/IgM ELISA)**

Nr. comandă: EC102.00

EBV IgG Liquor/CSF Standards

Nr. comandă: EC102L60

EBV IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set

Nr. comandă: EN102L65

Codificare cromatică: galben

NUMAI PENTRU DIAGNOSTICAREA IN VITRO

**VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

Tel.: +49-6142-6909-0

Fax: +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Cuprins

1. Domeniul de utilizare	3
2. Principiul testării	3
3. Conținutul pachetului (Kit-ul de testare IgG și IgM)	3
4. Depozitarea și durata de valabilitate a kit-ului de testare și a reactivilor gata de utilizare	3
5. Măsuri de precauție și atenționări	4
6. Materiale necesare, dar nelivrate	4
7. Procedura de testare	4
7.1 Materialul de examinare	4
7.2 Pregătirea reactivilor	4
7.3 Procedura de testare VIROTECH ELISA.....	5
7.4 Utilizarea procesoarelor ELISA	5
8. Evaluarea testului	5
8.1 Controlul validării testului	5
8.2 Calcularea unităților VIROTECH (VE.)	6
8.3 Schema de interpretare IgG și IgM.....	6
8.4 Limitele testului	6
9. Bibliografie	7
10. Schema procedurii de testare.....	8

1. Domeniul de utilizare

EBV ELISA este destinat pentru detectarea semi-cantitativă și calitativă a anticorpilor IgM și IgG față de virusul Epstein Barr. O declarație a diagnosticului cu privire la sero-negativitate, suspiciune referitor la o infecție primară cu EBV sau o infecție anterioară cu EBV se poate face dacă se combină cele două clase de anticorpi.

2. Principiul testării

Anticorpul căutat în serul uman formează un complex imun cu antigenul aplicat pe placa de micro-titrare. Imunoglobulinele nelegate sunt eliminate prin procese de spălare. Conjugatul enzimatic se atașează de acest complex. Conjugatul nelegat este din nou eliminat prin procese de spălare. După adăugarea soluției substrat (TMB) se produce o colorare albastră datorită enzimei legate (peroxidază). Culoarea se schimbă în galben atunci când se adaugă soluția de stopare.

3. Conținutul pachetului (Kit-ul de testare IgG și IgM)

1. **1 placă de microtitrare** formată din 96 de godeuri individuale detașabile, acoperite cu antigen, liofilizate,
2. **Tampon de diluție - PBS (albastru, gata de utilizare) 2 x 50 ml**, pH 7,2, cu agent conservant și Tween 20
3. **Soluție de spălare - PBS (concentrație 20x) 50 ml**, pH 7,2, cu agent conservant și Tween 20
4. **Martor negativ IgG 1.300 µl**, ser uman cu stabilizator de proteine și agent conservant, gata de utilizare
5. **Martor de întrerupere (cut- off) IgG 1.300 µl**, ser uman cu stabilizator de proteine și agent conservant, gata de utilizare
6. **Martor pozitiv IgG 1.300 µl**, ser uman cu stabilizator de proteine și agent conservant, gata de utilizare
7. **Martor negativ IgM, 1.300 µl**, ser uman cu stabilizator de proteine și agent conservant, gata de utilizare
8. **Martor de întrerupere (cut- off) IgM 1.300 µl**, ser uman cu stabilizator de proteine și agent conservant, gata de utilizare
9. **Martor pozitiv IgM 1.300 µl**, ser uman cu stabilizator de proteine și agent conservant, în stare gata de utilizare
10. **Conjugat IgG (anti-uman), 11 ml**, conjugat - peroxidază din hrean - (oaie sau capră), cu stabilizator de proteine și agent conservant în tampon Tris, gata de utilizare
11. **Conjugat IgM (anti-uman), 11 ml**, conjugat - și peroxidază din hrean - (oaie sau capră) cu FCS și agent conservant în tampon Tris, gata de utilizare
12. **Soluție substrat - tetrametil - benzidină (3,3',5,5'-TMB), 11 ml**, gata de utilizare
13. **Soluție de stopare de citrat, 6 ml**, conține un amestec de acizi

4. Depozitarea și durata de valabilitate a kit-ului de testare și a reactivilor gata de utilizare

Depozitați kit-ul de testare la 2-8°C. Durata de valabilitate a tuturor componentelor este indicată pe etichetele corespunzătoare; pentru durata de valabilitate a kit-ului consultați Certificatul de Control al Calității.

1. Benzile de microtitrare / godeurile individuale trebuie re-sigilate în pachet după scoaterea godeurilor individuale și depozitate cu desicant la 2-8°C. Reactivii trebuie re-depozitați la 2-8°C imediat după utilizare.
2. Conjugatul gata de utilizare și soluția substrat de TMB sunt fotosensibile și trebuie depozitate la întuneric. Dacă se observă o reacție de colorare a substratului diluat din cauza incidenței luminii, acesta nu mai poate fi utilizat.
3. Extrageți numai cantitatea de conjugat gata de utilizare sau TMB necesară pentru introducerea în test. Excesul de conjugat sau TMB extras nu poate fi returnat, dar trebuie evacuat la deșeuri.

Material	Stare	Depozitare	Durabilitate
Probe de analiză	diluate	de la +2 până la +8°C	max. 6 h
	nediluate	de la +2 până la +8°C	1 săptămână
Controale	după deschidere	de la +2 până la +8°C	3 luni
Placă pentru microtitrare	după deschidere	de la +2 până la +8° (depozitare în punga livrată cu substanță de uscare)	3 luni
Agent de absorbție a factorului reumatoid	nediluate, după deschidere	de la +2 până la +8°C	3 luni
	diluate	de la +2 până la +8°C	1 săptămână
Conjugat	după deschidere	de la +2 până la +8°C (ferit de lumină)	3 luni
Tetrametilbenzidină	după deschidere	de la +2 până la +8°C (ferit de lumină)	3 luni
Soluție de oprire	după deschidere	de la +2 până la +8°C	3 luni
	după deschidere	de la +2 până la +8°C	3 luni
	diluație finală (gata de utilizare)	de la +2 până la +25°C	4 săptămâni

5. Măsuri de precauție și atenționări

1. Drept seruri martor pot fi utilizate numai serurile care au fost testate și găsite negative pentru anticorpii HIV-1, anticorpii HIV-2, anticorpii HCV și antigenul de suprafață al virusului hepatitei B. Totuși, probele, probele diluate, martorii, conjugatele și fâșiile de micro titrare trebuie considerate drept materiale potențial infecțioase. Manipulați produsele în conformitate cu reglementările de laborator.
2. Componentele care conțin substanțe conservante, soluția de stopare de citrat și TMB au efect iritant la contactul cu pielea, ochii și mucoasele. În caz de contact cu părțile corpului, spălați imediat sub jet de apă și eventual consultați un medic.
3. Evacuarea materialelor uzate trebuie făcută în conformitate cu reglementările specifice țării în care se utilizează.

6. Materiale necesare, dar nelivate

1. Apă distilată / demineralizată
2. Pipetă cu opt canale 50 µl, 100 µl
3. Micro-pipete: 10 µl, 100 µl, 1.000 µl
4. Eprubete
5. Prosoape din hârtie sau hârtie absorbantă
6. Capac pentru plăcile ELISA
7. Container de gunoi pentru materialele infecțioase
8. Spălător de mâini ELISA sau dispozitiv automat de spălare a plăcilor EIA
9. Spectrofotometru pentru plăci ELISA, lungime de undă = 450 nm, lungime de referință = 620 nm (Lungime de undă de referință 620-690 nm)
10. Incubator

7. Procedura de testare

Modul exact de lucru specificat în manualul de utilizare VIROTECH Diagnostics reprezintă premisa pentru obținerea unor rezultate corecte.

7.1 Materialul de examinare

Ca material de analiză se pot utiliza serul și plasma (aici tipul anticoagulanților nu are relevanță), chiar dacă în acest prospect se menționează numai serul.

Pregătiți întotdeauna proaspăt diluția probei pacientului.

Pentru depozitare mai îndelungată, serurile trebuie congelate. Se va evita decongelarea repetată.

1. Trebuie utilizate numai serurile proaspete ne-inactivate.
2. Serurile hiperlipidice, hemolitice, contaminate microbial și tulburi nu trebuie utilizate (pot da rezultate fals pozitive / negative).

7.2 Pregătirea reactivilor

Sistemul Diagnostica de la VIROTECH Diagnostics oferă un grad înalt de flexibilitate în ceea ce privește posibilitatea de utilizare a tamponului diluat, soluției de spălare, a TMB, a soluției de stopare cu citrat, precum și a conjugatului, pentru toți parametrii și pentru toate tipurile de loturi. Martorii gata de utilizare (martor pozitiv, martor negativ, martor cut off) sunt specifici parametrilor și se utilizează exclusiv cu lotul de plăci indicat în Certificatul de Control al Calității.

1. Reglați incubatorul la 37°C și verificați setarea corespunzătoare de temperatură înainte de începerea incubării.
2. Aduceți toți reactivii la temperatura camerei înainte de a deschide ambalajul fâșiilor de microtitrare.
3. Agitați bine toate componentele lichide înainte de utilizare.
4. Aduceți la 1 l soluția de spălare concentrată, cu apă distilată sau demineralizată. Dacă în concentrat s-au format cristale, aduceți concentratul la temperatura camerei și agitați-l bine înainte de utilizare.
5. Un titru IgG ridicat sau factorii reumatoizi pot perturba detectarea specifică a anticorpilor IgM și pot conduce la rezultate fals pozitive, respectiv fals negative. **În consecință, pentru o determinare IgM corectă este necesară, pretratarea serurilor cu RF-SorboTech** (adsorbant VIROTECH). Pentru martorii IgM nu este necesară pre-tratarea cu adsorbant.

7.3 Procedura de testare VIROTECH ELISA

1. Pentru fiecare determinare test pipetați câte 100 µl de soluție tampon diluată (blanc), martorii IgG și IgM pozitivi, negativi și cut-off, precum și serurile diluate ale pacienților. Propunem determinarea în duplicat (blanc, martori și serul pacientului); pentru martorul cut-off aceasta este absolut necesară. Diluția de lucru a serurilor pacienților: 1+100; de ex. 10 µl ser + 1 ml tampon de diluție.
2. După pipetare începeți incubarea timp de 30 min. la 37°C (cu capac).
3. Terminați faza de incubare prin spălarea fâșiilor de microtitrare de 4 ori cu 350 – 400 µl soluție de spălare per godeu. Nu lăsați deloc soluție de spălare în godeuri. Îndepărtați reziduurile pe o coală de hârtie.
4. Pipetați în fiecare godeu câte 100 µl de conjugat gata de utilizare.
5. Incubarea conjugatilor: 30 min. la 37°C (cu capac).
6. Stopați incubarea conjugatului prin spălare de 4 ori (consultați punctul 3 de mai sus).
7. Pipetați câte 100 µl de TMB gata de utilizare în fiecare godeu.
8. Incubarea soluției substrat: 30 min. la 37°C (cu capac, a se păstra la întuneric).
9. Stoparea reacției substratului: în fiecare godeu pipetați 50 µl de soluție de stopare cu citrat. Scuturați placa atent și bine până când lichidul este complet amestecat și este vizibilă o culoare galbenă omogenă.
10. Măsurați extincția (OD) la 450/620 nm (Lungime de undă de referință 620-690 nm). Reglați fotometrul de așa manieră încât valoarea pentru blanc să fie dedusă din celelalte extincții. Extincțiile trebuie măsurate în interval de 1 oră după adăugarea soluției de stopare!

Consultați ultima pagină pentru schema procedurii de testare

7.4 Utilizarea procesoarelor ELISA

Toate testele VIROTECH Diagnostics ELISA pot fi utilizate pe procesoarele ELISA. Utilizatorul este obligat să efectueze periodic verificarea dispozitivelor (procesoarelor).

VIROTECH Diagnostics recomandă următoarea procedură:

1. VIROTECH Diagnostics recomandă efectuarea verificării dispozitivului în conformitate cu instrucțiunile fabricantului acestuia în momentul implementării procesorului ELISA, respectiv după reparațiile mai mari.
2. Se recomandă verificarea ulterioară a procesorului ELISA cu kit-ul de validare (EC250.00). O verificare regulată cu kit-ul de validare trebuie efectuată cel puțin o dată la trei luni, pentru a testa precizia procesorului.
3. Criteriile de eliberare a Certificatului de Control al Calității pentru produs trebuie îndeplinite pentru fiecare testare.

Datorită acestei proceduri, procesorul dvs. ELISA va funcționa corespunzător și va garanta asigurarea calității în laboratorul dvs.

8. Evaluarea testului

Martorii gata de utilizare servesc la determinarea semi-cantitativă a anticorpilor IgG și IgM specifici. Concentrația acestora poate fi exprimată în unități VIROTECH = VE. Fluctuațiile rezultate în urma procedurii de testare pot fi compensate prin această metodă de calcul și astfel se obține o reproductibilitate ridicată. Pentru calcularea VE utilizați media valorilor OD.

8.1 Controlul validării testului

a) Valorile OD

OD a blancului trebuie să fie $< 0,15$.

Valorile OD ale martorilor negativi trebuie să fie mai mici decât valorile OD specificate în Certificatul de Control al Calității. Valorile OD ale martorilor pozitivi, precum și a martorilor cut-off trebuie să fie mai mari decât valorile OD specificate în Certificatul de Control al Calității.

b) Unitățile VIROTECH (VE)

Unitățile VIROTECH (VE.) ale martorilor cut-off sunt definite ca 10 VE. Valoarea VE. calculată pentru martorii pozitivi trebuie să se încadreze în intervalele specificate în Certificatul de Control al Calității.

Dacă aceste cerințe (valori OD, VE.) nu sunt îndeplinite, testul trebuie repetat.

8.2 Calcularea unităților VIROTECH (VE.)

Extincția pentru valoarea blank (450/620 nm) trebuie scăzută din toate celelalte extincții.

$$VE_{(\text{martor pozitiv})} = \frac{OD_{(\text{martor pozitiv})}}{OD_{(\text{martor cut - off})}} \times 10$$
$$VE_{(\text{ser pacient})} = \frac{OD_{(\text{ser pacient})}}{OD_{(\text{martor cut - off})}} \times 10$$

8.3 Schema de interpretare IgG și IgM

Rezultat (VE)	Evaluare
< 9,0	negativ
9,0 - 11,0	la limită
> 11,0	pozitiv

1. Dacă valorile măsurate sunt peste intervalul de limită definit, acestea vor fi considerate pozitive.
2. Dacă valoarea VE. măsurată este la limita intervalului, înseamnă că nu există o concentrație semnificativă de anticorpi, probele fiind considerate la limită.
3. Pentru o detectare de precizie a unei infecții este necesară determinarea concentrației de anticorpi în două probe de ser. O probă trebuie recoltată direct la începutul infecției, iar o a doua probă la mai târziu (ser de convalescență). Concentrația de anticorpi a ambelor probe trebuie testată în paralel, adică într-o singură etapă de testare. Un diagnostic corect bazat pe evaluarea unei singure probe de ser nu este posibil.
4. Dacă valorile măsurate sunt sub intervalul de limită definit, în probă nu sunt prezenți anticorpi IgM specifici măsurabili. Probele vor fi considerate negative.

IgM	IgG	
+	+	Indicarea unei infecții primare
+	-	
-	+	Indicarea unei infecții anterioare
-	-	Indicarea unei seronegativități

8.4 Limitele testului

1. Interpretarea rezultatelor serologice va include întotdeauna tabloul clinic, date epidemiologice și alte rezultate de laborator disponibile.
2. Un rezultat ELISA negativ nu exclude complet o infecție cu EBV.
3. La diagnosticarea diferențială trebuie luați în considerare agenții infecțioși care dau tablouri clinice similare
4. Sunt cunoscute reactivități încrucișate ale virusului Epstein Barr față de familia virusurilor herpetici. La un rezultat IgM pozitiv, trebuie excluse în special reacțiile încrucișate față de CMV.
5. Un rezultat IgM negativ nu exclude posibilitatea unei infecții primare, deoarece în unele cazuri nu se formează IgM în timpul unei infecții acute (non-responder IgM) (8, 9).
6. În cazul suspiciunii clinice de infecție cu EBV și a unei serologii negative trebuie recoltată o a doua probă de sânge.
7. Un rezultat IgM EBV ELISA pozitiv trebuie verificat prin teste de confirmare specifice pentru EBV (VIROTECH EBV EA-D IgG ELISA, EBV EBNA1 IgG ELISA, EBV VCA IgG ELISA, EBV VCA IgM ELISA sau prin intermediul VIROTECH EBV IgG LINE Immunoblot / VIROTECH EBV IgM LINE Immunoblot).
8. Anticorpii care au fost transmiși pasiv la scurt timp înainte de examinare pot influența rezultatul serologic al EBV. Acesta poate fi de ex. cazul transfuziilor sangvine sau al anticorpilor transmiși pe cale maternă la noul-născut.

9. Bibliografie

1. Evans, A.S., J.C. Niedermann, L.C. Cenabre, B. West and V.A. Richards. (1975). A prospective evaluation of heterophile and EBV specific IgM antibody tests in clinical and subclinical infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 132:546-554.
2. Nikoskelainen, J., J. Lelkola and E. Lelkola. (1974). IgM antibodies specific for EBV in IM without heterophile agglutination test. *Br. Med. J.* 4:72-75.
3. Klemola, E., R. von Essen, G. Henle and W. Henle. (1970). IM-like disease with negative heterophile agglutination test. *J. Infect. Dis.* 121:608-614.
4. Sumaya, C.V. and Y. Ench. (1985). EBV mononucleosis in children. *II paediatrics.* 75:1011-1019.
5. Schmitz, H., D. Volz, C.H. Krainlek-Richert and M. Schere. (1972). Acute EBV infections in Children. *Med. Microbiol. Immunol.* 158:58-63.
6. Inoue, N. et al. (1992). Use of enzyme-linked immunosorbent assays with chimeric fusion proteins to titrate antibodies against Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *J. Clin. Micro.* 30(6):1442-1448.
7. Lennette, E.T. and W. Henle. (1987). Epstein-Barr virus infections: clinical and serological features. *Lab. Manage.* 25:23-28.
8. Bauer, G. (1995). Rationale und rationelle Epstein-Barr-Virus-Diagnostik. *Clin. Lab.* 41: 623-634.
9. Bauer, G. (2001). Simplicity through complexity: immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein-Barr virus serology. *Clin. Lab.* 47:223-230.
10. Modrow, S. und D. Falke (2010). Das Epstein-Barr Virus. S. 572-577. In: *Molekulare Virologie*, Spektrum Verlag, ISBN: 978-3-8274-1833-3.

Pregătirea probelor pacienților și a soluției de spălare

▼ **Soluția de spălare:** Aduceți concentratul la 1 l cu apă distilată / demineralizată

▼ **Probele IgG – Diluție
1:101**

de ex.:

10 µl ser / plasmă + 1.000 µl tampon de diluție
(TamponUL de diluție a serului este gata de utilizare)

▼ **Probele IgM - Diluție
1:101**

**Absorbția factorilor reumatoizi cu RF-
SorboTech**

de ex.:

5 µl ser / plasmă + 450 µl tampon de diluție +
1 picătură de RF-SorboTech, incubați timp de 15 min. la
temperatura camerei.

Procedura de testare

Incubare probe 30 minute la 37°C



Spălare de 4 ori



Incubare conjugat 30 minute la 37°C



Spălare de 4 ori



Incubare substrat 30 minute la 37°C



Stopare



Măsurarea
densității optice

100 µl probe pacienți

valoare blanc (tampon de diluție) și martorii

400 µl soluție de spălare

Îndepărtați reziduurile pe hârtie de filtru

100 µl conjugat

IgG, IgM

400 µl soluție de spălare

Îndepărtați reziduurile pe hârtie de filtru

100 µl substrat

50 µl soluție inhibitoare

agitați cu atenție

**Fotometru la 450/620 nm
(Lungime de undă de referință 620-
690 nm)**