

**VIROTECH EBV EA-D IgG ELISA
(EBV EA-D IgG ELISA)**

Bestell-Nr.: EC202.00 Farbcodierung: gelb/rot

**VIROTECH EBV EBNA1 IgG ELISA
(EBV EBNA1 IgG ELISA)**

Bestell-Nr.: EC204.00 Farbcodierung: gelb/hellblau

**VIROTECH EBV VCA IgG ELISA
(EBV VCA IgG ELISA)**

Bestell-Nr.: EC205G00 Farbcodierung: gelb/orange

**VIROTECH EBV VCA IgM ELISA
(EBV VCA IgM ELISA)**

Bestell-Nr.: EC203M00 Farbcodierung: gelb/schwarz

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Inhalt

1. Verwendungszweck	3
2. Diagnostische Bedeutung	3
3. Testprinzip	3
4. Packungsinhalt	3
4.1 Packungsinhalt EBV EA-D IgG ELISA, EBV EBNA1 IgG ELISA, EBV VCA IgG	3
4.2 Packungsinhalt EBV VCA IgM	3
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	4
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)	4
8. Testdurchführung	4
8.1 Untersuchungsmaterial	4
8.2 Vorbereitung der Reagenzien	5
8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung	5
8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren	5
9. Testauswertung	6
9.1 Testfunktionskontrolle	6
9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE)	6
9.3 Auswertungsschema IgG und IgM	6
9.4 Bedeutung der Antigene	7
9.5 Interpretationsschema	7
9.6 Grenzen des Tests	9
10. Leistungsdaten	9
10.1 Diagnostische Sensitivität	9
10.2 Sensitivität	9
10.3 Spezifität	10
10.4 Diagnostischer Faktor	10
10.5 Durchseuchung (erwartete Werte)	11
10.6 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)	11
10.7 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)	11
11. Literatur	11
12. Testablaufschemata	12

1. Verwendungszweck

Die VIROTECH EBV EA-D IgG, EBV EBNA1 IgG, EBV VCA IgG und IgM ELISA weisen semiquantitativ Antikörper gegen die verschiedenen Marker des Epstein Barr Virus nach. Die Kits dienen in Kombination der Differenzierung bzw. Absicherung von Seronegativität, Primärinfektion und abgelaufener Infektion.

2. Diagnostische Bedeutung

Das Epstein Barr Virus gehört zu der Familie der Herpesviridae und wird primär durch Speichel übertragen, indem es zunächst die Epithelzellen des Oropharynx und anschließend die B-Lymphozyten infiziert. Das Virus ist der Erreger der Infektiösen Mononukleose (IM) und der chronisch aktiven EBV-Infektion. Außerdem gibt es einen Zusammenhang zwischen EBV-Infektionen und dem Burkitt-Lymphom sowie Nasopharyngealkarzinomen in Afrika und Asien. Nach serologischen Untersuchungen sind ca. 95% der Erwachsenen seropositiv für EBV.

Primäre EBV Infektionen sind normalerweise asymptomatisch, können aber die Ursache für Infektiöse Mononukleose bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen sein. IM ist eine selbstlimitierende Erkrankung und ist charakterisiert durch Lymphadenopathie, Fieber, Hepatosplenomegalie und Leukozytose mit atypischen Lymphozyten (1-6).

Die Aufgabe der EBV-Serologie besteht in der Differenzierung bzw. Absicherung von Seronegativität, Primärinfektion sowie abgelaufener Infektion und der differentialdiagnostischen Abgrenzung zu klinisch ähnlichen symptomatischen Erkrankungen, hervorgerufen durch: CMV, Rubellavirus, Mumpsvirus, HIV, HAV, HBV, HCV und neurotrope Viren sowie Brucellosen, Listeriosen, Leptospirosen, Toxoplasmosen und neoplastische Erkrankungen wie Lymphome und Leukämien (7).

3. Testprinzip

Der im Humanserum gesuchte Antikörper bildet mit dem auf der Mikrotiterplatte fixierten Antigen einen Immunkomplex. Nicht gebundene Immunglobuline werden durch Waschprozesse entfernt. Mit diesem Komplex verbindet sich das Enzym-Konjugat. Nicht gebundene Immunglobuline werden wiederum durch Waschprozesse entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung (TMB) entsteht durch Enzymaktivität (Peroxidase) ein blauer Farbstoff, der nach Zugabe der Stopplösung nach Gelb umschlägt.

4. Packungsinhalt

4.1 Packungsinhalt EBV EA-D IgG ELISA, EBV EBNA1 IgG ELISA, EBV VCA IgG ELISA

- 1 Mikrotiterplatte, bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
- PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig), 2x50ml, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
- PBS-Waschlösung (20x konzentriert), 50ml, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
- IgG negative Kontrolle, 2000µl, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
- IgG cut-off Kontrolle, 2000µl, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
- IgG positive Kontrolle, 2000µl, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
- IgG-Konjugat (anti-human), 11ml, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
- Tetramethylbenzidin-Substratlösung (3,3',5,5'-TMB), 11ml, gebrauchsfertig
- Citrat-Stopplösung, 6ml, enthält ein Säuregemisch

4.2 Packungsinhalt EBV VCA IgM ELISA

1. 1 Mikrotiterplatte, bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
2. PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig), 2x50ml, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
3. PBS-Waschlösung (20x konzentriert), 50ml, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
4. IgM negative Kontrolle, 2000µl, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. IgM cut-off Kontrolle, 2000µl, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. IgM positive Kontrolle, 2000µl, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. IgM-Konjugat (anti-human), 11ml, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit FCS und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
8. Tetramethylbenzidin-Substratlösung (3,3',5,5'-TMB), 11ml, gebrauchsfertig
9. Citrat-Stopplösung, 6ml, enthält ein Säuregemisch

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien

Testkit bei 2-8°C aufbewahren. Die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Etikett vermerkt; Kit-Haltbarkeit siehe Qualitätskontrollzertifikat.

1. Nach Entnahme der benötigten Einzelkavitäten die restlichen Einzelkavitäten/Streifen in verschlossenem Beutel mit Trockenmittel bei 2-8°C lagern. Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder bei 2-8°C lagern.
2. Das gebrauchsfertige Konjugat und die TMB Substratlösung sind lichtempfindlich und müssen im Dunkeln aufbewahrt werden. Kommt es durch Lichteinfall zu einer Farbentwicklung der Substratlösung, so ist diese zu verwerfen.
3. Nur die für den Testansatz benötigte Menge vom gebrauchsfertigen Konjugat bzw. TMB entnehmen. Zuviel entnommenes Konjugat bzw. TMB darf nicht zurückgeführt werden, sondern ist zu verwerfen.

Material	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Untersuchungsproben	verdünnt	+2 bis +8°C	max. 6h
	unverdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
Kontrollen	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
MTP	nach Öffnen	+2 bis +8° (Lagerung im mitgelieferten Beutel mit Trockenmittelbeutel)	3Monate
RF Sorbo Tech	unverdünnt, nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	verdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3Monate
TMB	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3Monate
Stopplösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
Waschlösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +25°C	4Wochen

6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

1. Als Kontrollseren werden nur Seren verwendet, die getestet und als HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK und Hepatitis-B-surface-Antigen negativ befundet wurden. Trotzdem sollten alle Proben, verdünnte Proben, Kontrollen, Konjugate und die Mikrotiterstreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
2. Die Komponenten, die Konservierungsmittel enthalten, Citrat-Stopplösung und TMB, wirken reizend auf die Haut, Augen und Schleimhäute. Bei Berührungen die betroffenen Körperstellen sofort unter fließendem Wasser abwaschen und eventuell den Arzt aufsuchen.
3. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

1. Aqua dest./demin.
2. Mehrkanalpipette 50µl, 100µl
3. Mikropipetten: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Reagenzgläser
5. Zellstofftücher
6. Abdeckung für ELISA-Platten
7. Abfallbehälter für infektiöses Material
8. ELISA Handwascher bzw. automatischer Wascher für Mikrotiterplatten
9. Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit 450/620nm Filter (Referenzwellenlänge 620-690nm)
10. Brutschrank

8. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für das Erzielen korrekter Ergebnisse.

8.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial kann Serum und Plasma (hierbei ist die Art der Antikoagulanzen nicht von Relevanz) eingesetzt werden, auch wenn in dieser Gebrauchsanweisung nur Serum erwähnt ist.

Patienten-Verdünnungen immer frisch ansetzen.

Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren eingefroren werden. Mehrmaliges Auftauen sollte vermieden werden.

1. Nur frische, nicht inaktivierte Seren benutzen.
2. Hyperlipämische, hämolytische, mikrobiell kontaminierte Proben und trübe Seren nicht verwenden (falsch positive/negative Ergebnisse).

8.2 Vorbereitung der Reagenzien

Die VIROTECH Diagnostics System Diagnostik bietet ein hohes Maß an Flexibilität durch die Möglichkeit, Verdünnungs- und Waschpuffer, TMB, Citrat-Stopplösung sowie Konjugat parameter- und chargenübergreifend einzusetzen. Die gebrauchsfertigen Kontrollen (positive Kontrolle, cut-off Kontrolle, negative Kontrolle) sind parameterspezifisch und ausschließlich mit der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Plattencharge zu verwenden.

1. Brutschrank auf 37°C einstellen und sich vor Inkubationsbeginn vom Erreichen der Temperatur überzeugen.
2. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen; erst dann die Verpackung mit den Teststreifen öffnen.
3. Alle Flüssigkomponenten vor Gebrauch gut schütteln.
4. Waschlösungs-Konzentrat auf 1Liter mit Aqua dest./demin. auffüllen (bei eventueller Kristallbildung des Konzentrates dieses bitte vor dem Verdünnen auf Raumtemperatur bringen und vor Gebrauch gut schütteln).
5. Hohe IgG-Titer oder Rheumafaktoren können den spezifischen Nachweis von IgM-Antikörpern stören und zu falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen führen. **Für eine korrekte IgM-Bestimmung ist es daher erforderlich, die Seren mit VIROTECH RF-SorboTech (Adsorptionsmittel) vorzubehandeln.** Bei IgM-Kontrollen entfällt die Voradsorption.

8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung

1. Pro Testansatz 100µl des gebrauchsfertigen Verdünnungspuffers (Leerwert), der negativen, cut-off und der positiven IgG- und IgM-Kontrolle, sowie der verdünnten Patientenseren pipettieren. Wir empfehlen jeweils einen Doppelansatz (Leerwert, Kontrollen und Patientenseren); bei der cut-off Kontrolle ist ein Doppelansatz zwingend notwendig. Arbeitsverdünnung der Patientenseren: 1+100; z.B. 10µl Serum + 1ml Verdünnungspuffer.
2. Nach Pipettierung erfolgt die Inkubation für 30 Min. bei 37 °C (mit Abdeckung).
3. Beenden der Inkubationsperiode durch 4 maliges Waschen mit je 350-400µl Waschlösung pro Kavität. Waschlösung nicht in den Kavitäten stehen lassen, sondern letzte Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf einer Zellstoffunterlage entfernen.
4. 100µl des gebrauchsfertigen Konjugats in alle Kavitäten pipettieren.
5. Inkubation der Konjugate: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung).
6. Beenden der Konjugatinkubation durch 4 maliges Waschen (siehe Pkt. 3).
7. 100µl der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren.
8. Inkubation der Substratlösung: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung, dunkel stellen).
9. Abstoppen der Substratreaktion: in alle Kavitäten je 50µl Citrat-Stopplösung pipettieren. Die Platte vorsichtig und sorgfäl tig schütteln bis sich die Flüssigkeiten vollständig durchmischt haben und eine einheitliche gelbe Farbe sichtbar wird.
10. Extinktionen bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm) messen. Photometer so einstellen, dass der gemessene Leerwert von allen anderen Extinktionen abgezogen wird. Die photometrische Messung sollte innerhalb einer Stunde nach Zugabe der Stopplösung durchgeführt werden.

Testablaufschema siehe letzte Seite

8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren

Alle VIROTECH Diagnostics ELISAs können mit Hilfe von ELISA-Prozessoren abgearbeitet werden. Der Anwender ist verpflichtet eine regelmäßige Gerätevalidierung durchzuführen.

VIROTECH Diagnostics empfiehlt die folgende Vorgehensweise:

1. Bei Gerätestellung bzw. größeren Reparaturen Ihres ELISA Prozessors empfiehlt VIROTECH Diagnostics, die Validierung des Gerätes gemäß den Vorgaben des Geräteherstellers vorzunehmen.
2. Es wird empfohlen, anschließend den ELISA Prozessor mit dem Validierungskit (EC250.00) zu überprüfen. Diese regelmäßige Überprüfung mit dem Validierungskit sollte mindestens einmal pro Quartal durchgeführt werden.

3. Bei jedem Testlauf müssen die Freigabekriterien des Qualitätskontrollzertifikates zum Produkt erfüllt werden. Diese Vorgehensweise gewährleistet die einwandfreie Funktion Ihres ELISA Prozessors und dient darüber hinaus der Qualitätssicherung des Labors.

9. Testauswertung

Die gebrauchsfertigen Kontrollen dienen einer semiquantitativen Bestimmung spezifischer IgG- und IgM-Antikörper, deren Konzentration in VIROTECH Einheiten (=VE) angegeben wird. Durch die Testdurchführung bedingte Schwankungen werden über die Berechnungsmethode ausgeglichen und es wird damit eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht. Für die Berechnung der VE werden die Mittelwerte der OD-Werte eingesetzt.

9.1 Testfunktionskontrolle

a) OD-Werte

Der OD-Wert des Leerwertes sollte <0,15 sein.

Die OD-Werte der negativen Kontrollen sollten unterhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte, die OD-Werte der positiven Kontrollen sowie der cut-off Kontrollen sollten oberhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte liegen.

b) VIROTECH Einheiten (VE)

Die VIROTECH Einheiten (VE) der cut-off Kontrollen sind mit 10 VE definiert. Die berechneten VE der positiven Kontrollen sollten innerhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereiche liegen.

Werden die Anforderungen (OD-Werte, VE) nicht erfüllt, so ist der Test zu wiederholen.

9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE)

Die Extinktion des Leerwertes (450/620nm) muß von allen Extinktionen abgezogen werden.

$VE \text{ (positive Kontrolle)} = \frac{OD \text{ (positive Kontrolle)}}{OD \text{ (cut-off Kontrolle)}} \times 10$ $VE \text{ (Patientenserum)} = \frac{OD \text{ (Patientenserum)}}{OD \text{ (cut-off Kontrolle)}} \times 10$

9.3 Auswertungsschema IgG und IgM

Ergebnis (VE)	Beurteilung
< 9,0	negativ
9,0 – 11,0	grenzwertig
> 11,0	positiv

1. Liegen die gemessenen VE der Probe oberhalb des grenzwertigen Bereiches, so werden die Proben als positiv betrachtet.
2. Befinden sich die gemessenen VE innerhalb des angegebenen grenzwertigen Bereiches, liegt keine signifikant hohe Antikörperkonzentration vor; die Proben werden als grenzwertig betrachtet. Für den sicheren Nachweis einer Infektion ist es erforderlich, den Antikörpergehalt zweier Serumproben zu bestimmen. Eine Serumprobe sollte direkt nach Beginn der Infektion, eine zweite Probe 5-10 Tage später (rekonvaleszentes Serum) getestet werden. Die Antikörperkonzentration beider Proben muß parallel, d.h. in einem Testansatz bestimmt werden. Eine korrekte Diagnose aufgrund der Bewertung einer einzelnen Serumprobe ist nicht möglich.
3. Liegen die gemessenen Werte unterhalb des definierten grenzwertigen Bereiches, sind keine messbaren antigenspezifischen Antikörper in der Probe vorhanden. Die Proben werden als negativ betrachtet.

9.4 Bedeutung der Antigene

Antigen / Bezeichnung	Bedeutung der Antigene	Spezifität der Antikörper
EBNA1	Epstein-Barr Nuclear Antigen , ein virales Protein, das im Zellkern latent infizierter Zellen exprimiert wird. IgG-Antikörper gegen EBNA1 gelten als sichere Marker für eine abgelaufene EBV-Infektion. In seltenen Ausnahmefällen kann die IgG-Immunantwort gegen EBNA1 (<i>primär oder sekundär</i>) fehlen. Bei immunsupprimierten Patienten können die IgG-Antikörpertiter gegen EBNA1 stark abfallen (sekundärer EBNA1-Verlust).	IgG: Zentraler hochspezifischer Marker für eine <u>abgelaufene</u> EBV-Infektion
VCA	Es wurden verschiedene " Virus Capsid Antigene " beschrieben. Als immundominant werden darunter die Proteine gp125 und p18 angesehen. IgM Antikörper gegen VCA-gp125/p18 verschwinden i.d.R. einige Wochen nach der Infektion wieder, die IgG-Antikörper gegen VCA-gp125/p18 bleiben lebenslang erhalten. Bei einer Reaktivierung kommt es gelegentlich zur erneuten Bildung von IgM-Antikörpern gegen VCA-gp125/p18.	IgG: hochspezifischer genereller Marker für EBV-Infektionen IgM: hochspezifisch für eine EBV- <u>Primärinfektion</u>
EA-D	" Early Antigen-Diffuse " gehört zu den frühen Antigenen, die im viralen Replikationszyklus (aktive Infektionsphase) synthetisiert werden. IgG- und IgM-Antikörper gegen EA-D treten, bei gleichzeitig negativem EBNA-IgG, typischerweise bei Primärinfektionen auf. In der Rekonvaleszenz fallen IgG-Antikörper gegen EA-D ab, können jedoch bei EBV-Reaktivierungen auch wieder stark ansteigen. Eine Aussage über die klinische Relevanz einer EBV-Reaktivierung gibt dieser Antikörperanstieg allerdings nicht.	IgG: 1.) spezifisch für EBV- <u>Primärinfektionen</u> 2.) serologischer Marker für eine EBV-Reaktivierung

9.5 Interpretationsschema

Beurteilung	IgM	IgG		
	VCA	EBNA1	VCA	EA-D
Seronegativ	neg.	neg.	neg.	neg.
Hinweis auf Primärinfektion	pos./neg.	neg.	pos./neg.	pos./neg.
Hinweis auf abgelaufene Infektion	neg.	pos./neg.	pos./neg.	neg./pos.

pos./neg.: i.d.R. positiv

neg./pos.: i.d.R. negativ

Anwendung des diagnostischen Faktors:

Unter Umständen können VCA IgM-Antikörper trotz schon bestehender EBNA1 IgG-Immunantwort noch persistieren.

Bei diesen unklaren Fällen, wenn beide hochspezifischen Marker positiv sind, d.h. EBNA1 IgG für abgelaufene Infektionen und VCA IgM für Primärinfektionen, verhilft der **diagnostische Faktor von 1,5** zu einer klaren Diagnose. Die VE-Werte von EBNA1 IgG und VCA IgM werden verglichen und der Parameter, der mindestens um den Faktor 1,5 größer ist als der andere, gibt die Diagnose an.

Wenn EBNA1 IgG und VCA IgM positiv, dann gilt:

- VE-Wert von **EBNA1 IgG** \geq **1,5x** VE-Wert von **VCA IgM** \Rightarrow **abgelaufene Infektion**
- VE-Wert von **VCA IgM** \geq **1,5x** VE-Wert von **EBNA1 IgG** \Rightarrow **Primärinfektion**

Beispiel: VCA IgM: 25VE und EBNA1 IgG: 15VE

VE-Wert von **VCA IgM: 25VE** \geq **1,5x** 15VE-Wert von **EBNA1 IgG: 22,5VE**
VCA IgM: 25VE \geq **EBNA1 IgG: 22,5VE** => **Primärinfektion**

Da VCA IgM mindestens um den Faktor von 1,5 größer ist als EBNA1 IgG kann nun eine klare Diagnose einer Primärinfektion gestellt werden.

9.6 Grenzen des Tests

1. Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.
2. Ein negatives ELISA Ergebnis schließt die Möglichkeit einer Infektion mit EBV nicht völlig aus.
3. Infektionserreger mit ähnlich klinischem Bild sollten bei der Differentialdiagnose berücksichtigt werden.
4. Kreuzreaktivitäten des Epstein Barr Virus sind gegen die Familie der Herpes Viren bekannt. Vor allem Kreuzreaktivitäten gegen CMV sollten bei einem positiven IgM Ergebnis ausgeschlossen werden.
5. Ein negativer IgM Befund schließt die Möglichkeit einer Primärinfektion nicht aus, da in manchen Fällen einer akuten Infektion kein IgM gebildet wird (IgM-nonresponder) (7).
6. Zu Beginn einer Primärinfektion kann die Serologie von allen Parametern noch negativ sein. Bei klinischem Verdacht auf eine EBV Infektion mit negativer Serologie sollte eine zweite Blutabnahme erfolgen.
7. Ein negatives Anti-EBNA1 ist nicht zwingend ein Hinweis auf eine Primärinfektion. Bei immunsupprimierten Patienten kann es zu einem sekundären anti-EBNA1 Verlust kommen und bei 5% der EBV-Infizierten (EBNA1-nonresponder) wird kein anti-EBNA1 gebildet (7).
8. Eine akkurate Interpretation einer EBV Infektion sollte auf den Ergebnissen der Leitantigene VCA IgG-, VCA IgM- und EBNA1 IgG-Antikörpern mittels ELISA, Western Blot oder Immunoblot basieren. Das EA-D IgG kann eine zusätzliche Information bei Primärinfektionen und serologischen Reaktivierungen liefern.
9. Kurz vor der Untersuchung passiv übertragene Antikörper können das Ergebnis der EBV-Serologie beeinflussen. Das gilt z.B. bei Bluttransfusionen oder bei übertragenen mütterlichen Antikörpern auf den Säugling.
10. Die EBV-Serologie alleine lässt keine sichere Aussage über die klinische Relevanz einer Reaktivierung zu (9).

10. Leistungsdaten

10.1 Diagnostische Sensitivität

Zur Ermittlung der diagnostische Sensitivität wurde folgendes klinisch charakterisiertes Serenkollektiv untersucht: Patienten mit EBV-Primärinfektionen (n=51; Serenquelle: Dr. Gärtner, Homburg/Saar)
Als Referenz wurden Immunoblots und/oder IFTs durchgeführt.

Serenkollektiv (n=51)		VIROTECH EBV ELISA IgG + IgM Gesamtbefund	
		Primärinfektion	Abgelaufene Infektion
Klinischer Befund	Primärinfektion	51	0
	Abgelaufene Infektion	0	0

In der Gesamtbewertung stimmen die VIROTECH EBV ELISA Ergebnisse mit den klinischen Vorbefunden überein.

10.2 Sensitivität

Zur Ermittlung der Sensitivität wurden folgende Serenkollektive untersucht:

1. Patienten mit EBV-Primärinfektionen (n=123; Serenquelle: Dr. Gärtner, Homburg/Saar, Serenpanel eines kommerziellen Anbieters, Ringversuchsseren, Blutspenderseren und Routineseren).
2. abgelaufene EBV-Infektion (n=231; Serenquelle: Dr. Gärtner, Homburg/Saar, Ringversuchsseren, Serenpanel eines kommerziellen Anbieters, Blutspenderseren und Routineseren).

Als Referenz wurden Immunoblots und/oder IFTs durchgeführt.

Serenkollektiv (n=354)		VIROTECH EBV ELISA IgG + IgM Gesamtbefund	
		Primärinfektion	Abgelaufene Infektion
Befund	Primärinfektion	120	0
	Abgelaufene Infektion	0	221

In der Gesamtbewertung stimmen die VIROTECH EBV ELISA Ergebnisse mit den Vorbefunden überein. Unklare Fälle können bei der Sensitivität nicht berücksichtigt werden.

10.3 Spezifität

Zur Ermittlung der Spezifität wurden folgende Serenkollektive untersucht:

Seronegative (n=22, Serenquelle: Dr. Gärtner, Homburg/Saar, Ringversuchsseren), Schwangerenserum (n=15), Kinderseren (n=10) und Routineseren (n=32).

Als Referenz wurden Immunoblots und/oder IFTs durchgeführt.

*Serenkollektiv (n=79)		VIROTECH EBV ELISA IgG + IgM Gesamtbefund	
		Seronegativ	Abgelaufene Infektion
Befund	Seronegativ	29	0
	Abgelaufene Infektion	0	44

In der Gesamtbewertung stimmen die VIROTECH EBV ELISA Ergebnisse mit den Vorbefunden überein. Unklare Fälle können bei der Spezifität nicht berücksichtigt werden.

(*) Bei den unklaren Fällen handelt es sich zum einen um ein Kinderserum, das keinen eindeutigen serologischen ELISA-Befund ergab und zum anderen zeigten 4 Seren sowohl im ELISA als auch im Immunoblot nur ein positives VCA IgG-Ergebnis.

10.4 Diagnostischer Faktor

Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit des Diagnostischen Faktors wurden 6 unklare Fälle getestet, die ein positives Ergebnis sowohl im VCA IgM als auch im EBNA1 IgG zeigen.

Serum Nr.	VCA IgM		EBNA1 IgG		Klare Diagnose durch Diagnostischen Faktor
	VE-Wert	Bewertung	VE-Wert	Bewertung	
1	37,5	positiv	11,7	positiv	Primärinfektion
2	25,0	positiv	14,2	positiv	Primärinfektion
3	36,7	positiv	65,6	positiv	abgelaufene Infektion
4	20,7	positiv	78,9	positiv	abgelaufene Infektion
5	19,1	positiv	54,8	positiv	abgelaufene Infektion
6	21,1	positiv	67,0	positiv	abgelaufene Infektion

Bei allen aufgeführten Seren konnte mit Hilfe des diagnostischen Faktors eine klare Diagnose gestellt werden.

10.5 Durchseuchung (erwartete Werte)

Zur Ermittlung der in der Literatur (8) beschriebenen 95% Durchseuchung im Erwachsenenalter (abgelaufene EBV-Infektionen) wurden 80 Blutspenderseren getestet.

Seronegative	4
Abgelaufene Infektionen	76
Primärinfektionen	0

10.6 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)

In einem Assay wurden Streifen verschiedener Platten einer Charge mit zwei Seren getestet. Der so ermittelte Variationskoeffizient beträgt bei

VCA IgG, EBNA1: < 9%

VCA IgM, EA-D: < 15%

10.7 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)

In 10 unabhängigen Testansätzen wurden in verschiedenen Labors und von verschiedenen Testpersonen 3 Seren getestet. Der so ermittelte Variationskoeffizient beträgt bei

VCA IgG, VCA IgM, EBNA1, EA-D: < 20%

11. Literatur

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. Leikola and E. Klemola. (1974). IgM antibodies specific for EBV in IM without heterophile antibodies. Br. Med. J. Oct 12.4(5936)72-5.
3. Klemola, E., R. von Essen, G. Henle and W. Henle. (1970). Infectious-mononucleosis-like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus antibodies. J. Infect. Dis. Jun :121(6) :608-614.
4. Sumaya, C.V. and Y. Ench. (1985). Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. II. Heterophil antibody and viral-specific responses. Pediatrics Jun: 75(6)1011-9.
5. Schmitz, H., D. Volz, C. Krainick-Riechert and M. Schere. (1972). Acute Epstein-Barr virus infections in children. Med Microbiol Immunol. 158(1):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 Microbiol. Jun;30(6):1442-8.
7. Bauer, G. (2001). Simplicity through complexity: immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein-Barr virus serology. Clin Lab. 47(5-6):223-30.
8. Modrow, S. und D. Falke (2010). Das Epstein-Barr Virus. S. 572-577. In: Molekulare Virologie, Spektrum Verlag, ISBN: 978-3-8274-1833-3.
9. Gärtner BC et al. (2000). No correlation in Epstein-Barr virus reactivation between serological parameters and viral load. J Clin Microbiol. Jun;38(6): 2458

Vorbereitung der Patientenproben und Waschlösung

▼ **Waschlösung:** Konzentrat auf 1 Liter mit aqua dest./demin. auffüllen

▼ **IgG-Proben – Verdünnung**
1:101

z.B.:
10 µl Serum/Plasma + 1000 µl Verdünnungspuffer
(Serumverdünnungspuffer ist gebrauchsfertig)

▼ **IgM-Proben - Verdünnung**
1:101

Rheumafaktoradsorption mit RF-SorboTech

z.B.:
5 µl Serum/Plasma + 450 µl Verdünnungspuffer +
1 Tropfen RF-SorboTech bei RT 15 min inkubieren

Testdurchführung

