

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

Référence: EC202.00 Code couleur: jaune/rouge

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

Référence: EC204.00 Code couleur: jaune/ bleu clair

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

Référence: EC205G00 Code couleur: jaune/orange

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

Référence: EC203M00 Code couleur: jaune/noir

POUR DIAGNOSTIC IN-VITRO UNIQUEMENT

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

**Tél. : +49-6142-6909-0
Télécopie : +49-6142-966613
<http://www.virotechdiagnostics.com>**



Sommaire

1. Usage prévu.....	3
2. Principe du test	3
3. Contenu.....	3
3.1 Contenu (EBV EA-D, EBV EBNA1, EBV VCA IgG).....	3
3.2 Contenu (EBV VCA IgM).....	3
4. Stockage et conservation du kit de test et des réactifs prêts à l'emploi	3
5. Mesures de précaution et mises en garde	4
6. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit)	4
7. Réalisation du test	4
7.1 Echantillons	4
7.2 Préparation des réactifs	5
7.3 Réalisation du test ELISA VIROTECH	5
7.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA	5
8. Interprétation du test	6
8.1 Contrôle du bon fonctionnement du test.....	6
8.2 Calcul des unités VIROTECH (VE)	6
8.3 Schéma d'interprétation des IgG et des IgM.....	6
8.4 Signification des antigènes.....	6
8.5 Schéma d'interprétation	7
8.6 Limites du test.....	8
9. Littérature	8
10. Schéma du déroulement du test	8

1. Usage prévu

Les tests ELISA EBV EA-D, EBV EBNA1, EBV VCA permettent la détection semi-quantitative des différents marqueurs du virus d'Epstein-Barr. Combinés avec la différenciation, les kits ont pour fonction de confirmer une séronégativité, une primo-infection et une infection ancienne.

2. Principe du test

L'anticorps recherché dans le sérum humain forme un immunocomplexe avec l'antigène coaté sur la plaque. Les immunoglobulines non fixées sont éliminées par lavage. Le conjugué enzymatique se fixe à cet immunocomplexe. Les immunoglobulines non fixées sont à leur tour éliminées par lavage. Après l'ajout de substrat TMB en solution, l'activité enzymatique (peroxydase) engendre l'apparition d'un colorant bleu qui tourne au jaune lorsque l'on y ajoute la solution d'arrêt.

3. Contenu

3.1 Contenu (EBV EA-D, EBV EBNA1, EBV VCA IgG)

1. **Une microplaque**, composée de 96 puits détachables à revêtement antigénique, lyophilisée
2. **Tampon de dilution PBS (bleu, prêt à l'emploi), 2 x 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
3. **Solution de lavage PBS (concentrée au facteur 20), 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
4. **Contrôle négatif des IgG, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
5. **Contrôle cut-off des IgG, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
6. **Contrôle positif des IgG, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
7. **Conjugué IgG (anti-humain), 11 ml**, conjugué à la peroxydase de raifort (chèvre ou mouton) avec stabilisants des protéines et conservateur en tampon tris, prêt à l'emploi
8. **Substrat de tétraméthylbenzidine en solution (TBM 3',5,5'), 11 ml**, prêt à l'emploi
9. **Solution d'arrêt au citrate, 6 ml**, contient un mélange à l'acide

3.2 Contenu (EBV VCA IgM)

1. **Une microplaque**, composée de 96 puits détachables à revêtement antigénique, lyophilisée
2. **Tampon de dilution PBS (bleu, prêt à l'emploi), 2 x 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
3. **Solution de lavage PBS (concentrée au facteur 20), 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
4. **Contrôle négatif des IgM, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
5. **Contrôle cut-off des IgM, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
6. **Contrôle positif des IgM, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
7. **Conjugué IgM (anti-humain), 11 ml**, conjugué à la peroxydase de raifort (chèvre ou mouton) avec sérum fœtal de veau (FCS) et conservateur en tampon tris, prêt à l'emploi
8. **Substrat de tétraméthylbenzidine en solution (TBM 3',5,5'), 11 ml**, prêt à l'emploi
9. **Solution d'arrêt au citrate, 6 ml**, contient un mélange à l'acide

4. Stockage et conservation du kit de test et des réactifs prêts à l'emploi

Stocker le kit à une température comprise entre 2 et 8 °C. La durée de conservation des différents composants est indiquée sur leur étiquette ; la durée de conservation du kit est indiquée sur le certificat de contrôle-qualité.

1. Après avoir détaché les puits individuels nécessaires, remettre les puits restants dans un sachet fermé hermétiquement et contenant un dessiccateur, puis stocker ce sachet à une température comprise entre 2 et 8 °C. Stocker à nouveau les réactifs à une température comprise entre 2 et 8 °C immédiatement après leur utilisation.
2. Le conjugué prêt à l'emploi et le substrat TMB en solution sont photosensibles et doivent donc être conservés à l'abri de toute lumière. Si la solution de substrat se colore suite à une exposition à la lumière, jeter la solution.
3. Prélever uniquement la quantité de conjugué prêt à l'emploi ou de TMB nécessaire à la réalisation du test. Si un excédent de conjugué ou de TMB a été prélevé, ne pas le réinjecter dans son récipient, mais l'éliminer.

Matériel	Etat	Conservation	Date de péremption
Echantillons d'essai	Dilué	+2 jusqu'à +8° C	max. 6 h
	Non dilué	+2 jusqu'à +8° C	1 semaine
Contrôles	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Plaque de microtitration	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (conservation dans le sachet fourni avec un sachet d'agent de dessiccation)	3 mois
Absorbant facteur rhumatoïde	Non dilué, Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué	+2 jusqu'à +8° C	1 semaine
Conjugué	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Tétraméthylbenzidine (TMB)	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Solution d'arrêt	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Solution de lavage	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué final (prêt à l'emploi)	+2 jusqu'à +25° C	4 semaines

5. Mesures de précaution et mises en garde

1. Les sérums de contrôle utilisés ont réagi négativement aux tests de détection des anticorps du HIV1, du HIV2, de l'hépatite C ainsi que de l'antigène HBs. Toutefois, tous les échantillons, les échantillons dilués, les contrôles, les conjugués et la microplaque doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés comme tels. Les dispositions légales respectives en vigueur pour les laboratoires doivent être appliquées.
2. Les composants contenant des conservateurs, la solution d'arrêt au citrate et la tétraméthylbenzidine (TBM), ont un effet irritant sur la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement les parties du corps touchées à l'eau courante et consulter éventuellement un médecin.
3. Eliminer le matériel et les produits utilisés dans le respect des directives nationales en vigueur.

6. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit)

1. Eau distillée/déminéralisée
2. Pipette à plusieurs conduits 50 µl, 100 µl
3. Micropipettes : 10 µl, 100 µl, 1000 µl
4. Tubes à essai
5. Chiffons en cellulose
6. Couvercles pour les plaques ELISA
7. Poubelle pour les déchets infectieux
8. Dispositif de lavage manuel pour test ELISA, ou dispositif de lavage automatique des plaques de microtitrage.
9. Spectrophotomètre pour plaques de microtitration avec filtre 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm)
10. Incubateur

7. Réalisation du test

Le respect scrupuleux des consignes de travail de VIROTECH Diagnostics est le préalable à obtenir des résultats corrects.

7.1 Echantillons

Le sérum ou le plasma (en l'occurrence, le type d'anticoagulants n'est pas important) peut être utilisé comme matériel à analyser, même lorsque seul le sérum est mentionné dans la notice.

Les échantillons doivent être préparé directement avant commencer le test.

Lorsque les sérums doivent être conservés pendant une période prolongée, ceux-ci doivent être congelés. Il est déconseillé de décongeler les sérums plusieurs fois.

1. N'utiliser que des sérums frais non inactivés.
2. Ne pas utiliser d'échantillons hyperlipémiques, hémolytiques ou contaminés par des bactéries, ni de sérums à l'aspect trouble (résultats positifs/négatifs faussés).

7.2 Préparation des réactifs

Le système de diagnostic VIROTECH Diagnostics offre une grande flexibilité, grâce à la possibilité d'utiliser le tampon de dilution et de lavage, le TMP, la solution d'arrêt au citrate ainsi que le conjugué pour tous les paramètres et les lots. Les contrôles prêts à l'emploi (contrôles positifs, les contrôles cut-off et contrôles négatifs) sont spécifiques aux paramètres et doivent être utilisés exclusivement avec le lot de plaque indiqué dans le certificat de contrôle-qualité.

1. Régler l'incubateur à 37 °C et vérifier que cette température règne bien à l'intérieur de celui-ci avant de commencer l'incubation.
2. Amener tous les réactifs à la température ambiante ; ouvrir ensuite l'emballage avec les barettes.
3. Bien agiter les composants liquides avant leur utilisation.
4. Compléter le concentré de solution de lavage avec de l'eau distillée / déminéralisée pour obtenir 1 litre (au cas où le concentré formerait éventuellement des cristaux, portez-le à température ambiante avant de le diluer et agitez bien avant utilisation).
5. Des titrages d'IgG ou des facteurs rhumatismaux élevés peuvent gêner la mise en évidence d'anticorps IgM ou engendrer l'obtention de résultats positifs ou négatifs erronés. **Les sérums doivent être prétraités avec le RF-SorboTech** (agent d'adsorption VIROTECH). Dans le cas de contrôles des IgM, l'adsorption préliminaire n'est pas nécessaire.

7.3 Réalisation du test ELISA VIROTECH

1. Pour chaque série, pipeter 100 µl de tampon de dilution (valeur à blanc) prêt à l'emploi, de contrôle négatif, de contrôle cut-off et de contrôle positif des IgG et des IgM, ainsi que des sérums dilués des patients. Nous recommandons d'opter pour une double distribution (blanc, contrôles et sérums patients) : pour le contrôle cut-off, le passage en double est absolument indispensable. Dilution de travail pour les sérums patients : 1+100 ; par ex. 10 µl de sérum + 1 ml de tampon de dilution.
2. Après la distribution, incuber la plaque à 37 °C pendant 30 minutes (avec couvercle).
3. Mettre fin à la période d'incubation par quatre lavages effectués chacun à l'aide de 350 à 400 µl de solution de lavage pour chaque puits. Ne pas laisser de solution de lavage dans les puits, mais en éliminer les derniers restes en tapotant la plaque sur une protection en cellulose étendue à cet effet sur le plan de travail.
4. Déposer 100 µl de conjugué prêt à l'emploi dans tous les puits.
5. Incubation des conjugués : 30 minutes à 37 °C (avec couvercle).
6. Mettre fin à l'incubation du conjugué en effectuant quatre lavages (voir le point 3).
7. Déposer 100 µl de substrat TMB dans chacun des puits.
8. Incubation de la solution de substrat : 30 minutes à 37 °C (avec couvercle, placer dans un endroit sombre).
9. Arrêt de la réaction : déposer 50 µl de solution d'arrêt dans chacun des puits. Agiter la plaque avec précaution, jusqu'à ce que les liquides se soient complètement mélangés et qu'ils présentent une couleur jaune uniforme.
10. Mesurer les densités optiques (D.O) à 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm). Régler le photomètre de façon à ce que la valeur à blanc mesurée soit déduite de toutes les autres extinctions. La mesure photométrique doit être réalisée en l'espace d'une heure à partir de l'ajout de la solution d'arrêt.

Schéma du déroulement du test, voir dernière page

7.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA

Tous les tests ELISA de VIROTECH Diagnostics peuvent être effectués à l'aide de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA. L'utilisateur s'engage à procéder à une validation de l'appareil à intervalles réguliers.

VIROTECH Diagnostics recommande la procédure suivante :

1. Lors de la mise à disposition de l'appareil ou lorsque des réparations importantes ont été effectuées sur le dispositif de traitement automatisé des tests ELISA, VIROTECH Diagnostics recommande de réaliser la validation du dispositif en se conformant aux directives du fabricant de l'appareil.
2. Il est recommandé de contrôler ensuite le dispositif de traitement automatisé des tests ELISA à l'aide du kit de validation (EC250.00). Ce contrôle régulier à l'aide du kit de validation doit être effectué au moins une fois par trimestre.
3. Lors de chaque cycle d'essai, les critères de validation du certificat de contrôle-qualité du produit doivent impérativement être remplis.

Cette manière de procéder assure le fonctionnement irréprochable de votre processeur ELISA et sert de plus à la garantie de qualité du laboratoire.

8. Interprétation du test

Les contrôles prêts à l'emploi sont destinés à une détermination semi-quantitative des anticorps IgG et IgM dont la concentration est indiquée en unités VIROTECH (VE). Les fluctuations dues à la réalisation du test sont compensées par la méthode de calcul, ce qui permet d'obtenir une reproductibilité élevée. Pour le calcul des unités VIROTECH (VE), utiliser les moyennes des valeurs de DO.

8.1 Contrôle du bon fonctionnement du test

a) Valeurs de DO

La valeur de DO de la valeur à blanc doit être <0,15.

Les valeurs de DO des contrôles négatifs doivent être inférieures aux valeurs de DO indiquées dans le certificat de contrôle-qualité, les valeurs de DO des contrôles positifs et des contrôles cut-off doivent être supérieures aux valeurs de DO indiquées dans le certificat de contrôle-qualité.

b) Unités VIROTECH (VE)

Les unités VIROTECH (VE) du contrôle cut-off sont fixées à 10 VE. Le nombre de VE calculées pour le contrôle positif doit être compris dans la plage indiquée dans le certificat de contrôle-qualité.

Si les exigences (concernant les valeurs DO et les unités VIROTECH) ne sont pas remplies, répéter le test.

8.2 Calcul des unités VIROTECH (VE)

L'extinction de la valeur à blanc (450/620 nm) doit impérativement être soustraite de toutes les extinctions.

$$VE_{\text{(contrôle positif)}} = \frac{DO_{\text{(contrôle positif)}}}{DO_{\text{(contrôle cut - off)}} \times 10$$
$$VE_{\text{(sérum patient)}} = \frac{DO_{\text{(sérum patient)}}}{DO_{\text{(contrôle cut - off)}} \times 10$$

8.3 Schéma d'interprétation des IgG et des IgM

Résultat (VE)	Évaluation
< 9,0	négatif
9,0 à 11,0	plage limite
> 11,0	positif

1. Si le nombre d'unités VIROTECH (VE) mesurées pour l'échantillon est supérieur à la limite supérieure de la plage limite, les échantillons seront considérés comme positifs.
2. Si le nombre d'unités VIROTECH (VE) mesurées est compris dans la plage limite indiquée, la concentration en anticorps n'est pas significativement élevée ; les échantillons seront alors considérés comme étant à la limite. Pour qu'une infection soit mise en évidence de façon sûre, il est nécessaire de déterminer la teneur en anticorps des deux échantillons sériques. Un échantillon sérique doit être testé directement après le début de l'infection, un deuxième échantillon cinq à dix jours plus tard (sérum de convalescent). La concentration des deux échantillons doit être déterminée de façon parallèle. Il n'est pas possible d'établir de diagnostic correct sur la base de l'évaluation d'un seul échantillon sérique.
3. Si les valeurs mesurées sont inférieures à la plage limite définie, l'échantillon ne contient pas d'anticorps spécifiques aux antigènes en quantité décelable. Les échantillons seront alors considérés comme étant négatifs.

8.4 Signification des antigènes

Désignation de l'antigène	Signification des antigènes	Spécificité des anticorps
EBNA1	Antigène nucléaire anti-Epstein-Barr (EBNA), une protéine virale exprimée de façon latente dans le noyau des cellules infectées. Les anticorps IgG anti-EBNA1 sont reconnus comme étant des marqueurs sûrs d'une infection ancienne à EBV. Dans de rares cas exceptionnels, on a une absence de	IgG : marqueur central hautement spécifique d'une infection ancienne à EBV

	réponse immunitaire (primaire ou secondaire) par IgG anti-EBNA1. Chez les patients immunodéprimés, il est possible que le titre d'anticorps IgG anti-EBNA1 ait fortement baissé (perte secondaire anti-EBNA1).	
VCA	Différents « antigènes de virus à capsid (VCA) » ont été décrits. Les protéines gp125 et p18 sont considérées comme étant immunodominantes. En règle générale, les anticorps IgM anti-VCA-gp125/p18 disparaissent quelques semaines après l'infection, les anticorps IgG anti-VCA-gp125/p18 restent à vie. Lors d'une réactivation, il arrive occasionnellement que l'organisme produise à nouveau des anticorps IgM anti-VCA-gp125/p18.	IgG : marqueur général hautement spécifique des infections à EBV IgM : hautement spécifique d'une <u>primo-infection</u> à EBV
EA-D	L'antigène précoce diffus (E arly A ntigen- D iffuse) appartient à la catégorie des antigènes précoces synthétisés au cours du cycle de réplication virale (phase active de l'infection). De façon typique, les anticorps IgG et IgM anti-EA-D apparaissent – en cas d'IgG anti-IgG EBNA négatifs – dans le cas de primo-infections. Pendant la convalescence, le taux d'anticorps IgG anti-EA-D tombe, mais il peut remonter brusquement en cas de réactivations par EBV. Toutefois, la montée du taux d'anticorps ne confirme pas la pertinence clinique d'une réactivation par EBV.	IgG : 1.) spécifique des <u>primo-</u> <u>infections</u> à EBV 2.) marqueur sérologique d'une réactivation par EBV

8.5 Schéma d'interprétation

Évaluation	IgM	IgG		
		EBNA1	VCA	EA-D
	VCA	EBNA1	VCA	EA-D
Séronégativité	nég.	nég.	nég.	Nég.
Indication d'une infection primaire	Pos./ nég.	nég.	pos./ nég.	pos./ nég.
Indication d'une infection antérieure	nég.	pos./ nég.	pos./ nég.	nég./pos.

pos./nég. : en règle générale, positif

nég./pos. : en règle générale, négatif

Application du facteur diagnostique :

Le cas échéant, les anticorps IgM anti-VCA peuvent persister bien qu'il y ait déjà une réponse immunitaire par IgG anti-EBNA1.

Dans ces cas douteux, si les deux marqueurs hautement spécifiques sont positifs, c.à.d IgG anti-EBNA1 pour les infections anciennes et IgM anti-VCA pour les primo-infections, le **facteur diagnostique de 1,5** aide à obtenir un diagnostic clair. Les valeurs VE des IgG anti-EBNA1 et des IgM anti-VCA sont comparées et le paramètre dont la valeur est au moins 1,5 fois plus élevée que celle de l'autre donne le diagnostic.

Si les IgG anti-EBNA1 et les IgM anti-VCA sont positifs :

- Valeur VE d'**IgG anti-EBNA1** \geq **1,5x** valeur VE d'**IgM anti-VCA** \Rightarrow **Infection ancienne**
- Valeur VE d'**IgM anti-VCA** \geq **1,5x** valeur VE d'**IgG anti-EBNA1** \Rightarrow **Primo-infection**

Exemple : IgM anti-VCA : 25VE et IgG anti-EBNA1 : 15VE

Valeur VE d'**IgM anti-VCA : 25VE** \geq **1,5x** 15VE-Valeur d'**IgG anti-EBNA1 : 22,5VE**

IgM anti-VCA : 25VE \geq **IgG anti-EBNA1 : 22,5VE** \Rightarrow **Primo-infection**

Étant donné que la valeur d'IgM anti-VCA est au moins 1,5 plus élevée que celle d'IgG anti-EBNA1, le diagnostic d'une primo-infection est clairement posé.

8.6 Limites du test

1. L'interprétation des résultats sérologiques doit toujours inclure le tableau clinique, les données épidémiologiques et les éventuels autres résultats d'analyses existants.
2. Un résultat négatif de test ELISA n'exclut pas complètement la possibilité d'une infection à EBV.
3. Lors diagnostic différentiel, il conviendra de prendre en compte les agents pathogènes infectieux à tableau clinique similaire.
4. Il existe des réactivités croisées reconnues du virus d'Epstein-Barr contre la famille des virus herpétiques. En cas de résultat positif des IgM, il faudra exclure toute réactivité croisée anti-CMV.
5. Un résultat négatif des IgM n'écarte pas l'éventualité d'une primo-infection, car dans certains cas d'infection aiguë, il peut arriver que l'organisme ne produise pas d'IgM (non-répondeurs en IgM) (7).
6. Au début d'une primo-infection, la sérologie de tous les paramètres peut être encore négative. En cas de soupçon clinique d'une infection à EBV et d'une sérologie négative, effectuer un deuxième prélèvement sanguin.
7. Un anti-EBNA1 négatif n'est pas forcément un indice d'une primo-infection. Chez les patients immunodéprimés, une perte secondaire anti-EBNA1 peut se produire et chez 5% des patients présentant une infection à EBV (non répondeurs EBNA1) , il n'y a pas de formation d'anti-EBNA1 (7).
8. Une interprétation exacte d'une infection par l'EBV doit se baser sur les résultats de la détection des anticorps IgG anti-VCA, IgM anti-VCA et IgG anti-EBNA1 au moyen des méthodes ELISA, Western Blot ou Immunoblot. La détection des IgG anti-EA-D peut fournir des informations complémentaires en cas de primo-infections et de réactivations sérologiques.
9. Juste avant l'examen, des anticorps transférés passivement peuvent influencer le résultat de la sérologie EBV. Cette situation peut par exemple survenir dans le cas de transfusions sanguines ou lorsque des anticorps de la mère sont transmis au nourrisson.
10. La sérologie EBV à elle seule ne permet pas de se prononcer de manière sûre sur la pertinence clinique d'une réactivation (11).

9. Littérature

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

10. Schéma du déroulement du test

Préparation des échantillons patients et de la solution de lavage

▼ **Solution de lavage** : ajouter de l'eau distillée/déminéralisée au concentré pour obtenir un volume total d'un litre.

▼ **Dilution du Échantillons IgG à 1:101**

Exemple :

10 µl de sérum/plasma + 1000 µl de tampon de dilution
(le tampon de dilution est prêt à l'emploi)

▼ **Dilution du Échantillons IgM à 1:101**

Adsorption du facteur rhumatoïde avec RF-SorboTech

Exemple :

Incuber 5 µl de sérum/plasma + 450 µl de tampon de dilution +
1 goutte RF-SorboTech pendant 15 minutes

Réalisation du test

Incubation des échantillons	30 minutes à 37 °C	100 µl d'échantillons patients blanc (tampon de dilution) et contrôles
↓		
Laver 4 fois		400 µl de solution de lavage bien tapoter
↓		
Incubation du conjugué	30 minutes à 37 °C	100 µl de conjugué IgG, IgM
↓		
Laver 4 fois		400 µl de solution de lavage bien tapoter
↓		
Incubation du substrat	30 minutes à 37 °C	100 µl de substrat
↓		
Arrêt		50 µl de solution d'arrêt agiter avec précaution
↓		
Mesure de l'extinction		photomètre à 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm)