

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

Αρ. παραγγελίας: EC202.00 Χρωματική σήμανση: κίτρινο/κόκκινο

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

Αρ. παραγγελίας: EC204.00 Χρωματική σήμανση: κίτρινο/γαλάζιο

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

Αρ. παραγγελίας: EC205G00 Χρωματική σήμανση: κίτρινο/πορτοκαλί

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

Αρ. παραγγελίας: EC203M00 Χρωματική σήμανση: κίτρινο/μαύρο

ΜΟΝΟ ΓΙΑ IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ

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

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



Περιεχόμενα

1. Προοριζόμενη χρήση.....	3
2. Αρχή της δοκιμασίας	3
3. Περιεχόμενα συσκευασίας (Κιτ δοκιμασίας IgG και IgM)	3
3.1 Περιεχόμενα συσκευασίας EBV EA-D, EBV EBNA1, EBV VCA IgG	3
3.2 Περιεχόμενα συσκευασίας EBV VCA IgM.....	3
4. Φύλαξη και διάρκεια ζωής του κιτ δοκιμασίας και των έτοιμων για χρήση αντιδραστηρίων	3
5. Μέτρα προφύλαξης και προειδοποιητικές υποδείξεις.....	4
6. Επιπλέον απαιτούμενα υλικά (δεν παρέχονται)	4
7. Εκτέλεση δοκιμασίας.....	4
7.1 Υλικό εξέτασης.....	5
7.2 Προετοιμασία των αντιδραστηρίων.....	5
7.3 Εκτέλεση δοκιμασίας VIROTECH ELISA.....	5
7.4 Χρήση αναλυτών ELISA.....	6
8. Αξιολόγηση της δοκιμασίας.....	6
8.1 Έλεγχος λειτουργίας δοκιμασίας	6
8.2 Υπολογισμός των μονάδων VIROTECH (VE)	6
8.3 Πίνακας αξιολόγησης IgG και IgM	6
8.4 Σημασία των αντιγόνων	7
8.5 Πίνακας ερμηνείας	7
8.6 Περιορισμοί της δοκιμασίας.....	8
9. Βιβλιογραφία	8
10. Πίνακας εκτέλεσης δοκιμασίας.....	10

1. Προοριζόμενη χρήση

Οι δοκιμασίες ELISA EBV EA-D, EBV EBNA1, EBV VCA προορίζονται για την ημιποσοτική ανίχνευση αντισωμάτων κατά των διαφόρων δεικτών του ιού Epstein Barr (EBV). Η συνδυασμένη χρήση των κιτ παρέχει τη δυνατότητα διαφοροποίησης/επιβεβαίωσης της οροαρνητικότητας, μίας πρωτογενούς λοίμωξης ή μίας παρελθούσας λοίμωξης.

2. Αρχή της δοκιμασίας

Το προς ανίχνευση αντίσωμα συνδέεται με το καθηλωμένο στην πλάκα μικροτιτλοδότησης αντιγόνο σε ένα ανοσοσύμπλοκο. Οι μη συνδεδεμένες ανοσοσφαιρίνες απομακρύνονται με τη διαδικασία πλύσης. Σε αυτό το σύμπλοκο προσδένεται το ενζυμικό σύμπλεγμα. Οι μη συνδεδεμένες ανοσοσφαιρίνες απομακρύνονται με τη σειρά τους κατά τη διαδικασία πλύσης. Μετά από προσθήκη του διαλύματος υποστρώματος (TMB), η ενζυμική δραστηριότητα (υπεροξειδάση) οδηγεί στη δημιουργία μίας μπλε χρωστικής, το χρώμα της οποίας μετατρέπεται σε κίτρινο μετά την προσθήκη του ανασχετικού διαλύματος.

3. Περιεχόμενα συσκευασίας (Κιτ δοκιμασίας IgG και IgM)

3.1 Περιεχόμενα συσκευασίας EBV EA-D, EBV EBNA1, EBV VCA IgG

1. 1 πλάκα μικροτιτλοδότησης, αποτελούμενη από 96 μεμονωμένα, αποσπώμενα, με λυοφιλοποιημένο αντιγόνο επιστρωμένα φρεάτια
2. Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης PBS (μπλε, έτοιμο για χρήση) 2x50ml, pH 7,2, με συντηρητικό και Tween 20.
3. Διάλυμα πλύσης PBS (20 φορές συμπυκνωμένο), 50ml, pH 7,2, με συντηρητικό και Tween 20.
4. Αρνητικός ορός ελέγχου IgG, 2000μl, ανθρώπινος ορός με σταθεροποιητικές πρωτεΐνες και συντηρητικό, έτοιμος για χρήση
5. Ορός ελέγχου αποκλεισμού IgG, 2000μl, ανθρώπινος ορός με σταθεροποιητικές πρωτεΐνες και συντηρητικό, έτοιμος για χρήση
6. Θετικός ορός ελέγχου IgG, 2000μl, ανθρώπινος ορός με σταθεροποιητικές πρωτεΐνες και συντηρητικό, έτοιμος για χρήση
7. Σύζευγμα IgG (αντί-ανθρώπου), 11ml, (προβάτου ή αίνας)-σύζευγμα ραφανιδικής υπεροξειδάσης με σταθεροποιητικές πρωτεΐνες και συντηρητικό σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris, έτοιμο για χρήση
8. Τετραμεθυλβενζιδίνη – Διάλυμα υποστρώματος (3,3',5,5'-TMB), 11ml, έτοιμο για χρήση
9. Ανασχετικό διάλυμα κιτρικού άλατος, 6ml, περιέχει μίγμα οξέων

3.2 Περιεχόμενα συσκευασίας EBV VCA IgM

1. 1 πλάκα μικροτιτλοδότησης, αποτελούμενη από 96 μεμονωμένα, αποσπώμενα, επιστρωμένα με λυοφιλοποιημένο αντιγόνο φρεάτια.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης PBS (μπλε, έτοιμο για χρήση) 2x50ml, pH 7,2, με συντηρητικό και Tween 20.
3. Διάλυμα πλύσης PBS (20 φορές συμπυκνωμένο), 50ml, pH 7,2, με συντηρητικό και Tween 20.
4. Αρνητικός ορός ελέγχου IgM, 2000μl, ανθρώπινος ορός με σταθεροποιητικές πρωτεΐνες και συντηρητικό, έτοιμος για χρήση
5. Ορός ελέγχου αποκλεισμού IgM, 2000μl, ανθρώπινος ορός με σταθεροποιητικές πρωτεΐνες και συντηρητικό, έτοιμος για χρήση
6. Θετικός ορός ελέγχου IgM, 2000μl, ανθρώπινος ορός με σταθεροποιητικές πρωτεΐνες και συντηρητικό, έτοιμος για χρήση
7. Σύζευγμα IgM (αντι-ανθρώπου), 11ml, (προβάτου ή αίνας)-σύζευγμα ραφανιδικής υπεροξειδάσης με FCS και συντηρητικό σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris, έτοιμο για χρήση
8. Τετραμεθυλβενζιδίνη – Διάλυμα υποστρώματος (3,3',5,5'-TMB), 11ml, έτοιμο για χρήση
9. Ανασχετικό διάλυμα κιτρικού άλατος, 6ml, περιέχει μίγμα οξέων

4. Φύλαξη και διάρκεια ζωής του κιτ δοκιμασίας και των έτοιμων για χρήση αντιδραστηρίων

Φυλάσσετε το κιτ δοκιμασίας στους 2-8°C. Η διάρκεια ζωής των μεμονωμένων συστατικών αναγράφεται στην εκάστοτε ετικέτα. Για τη διάρκεια ζωής του κιτ ανατρέξτε στο πιστοποιητικό ελέγχου ποιότητας.

1. Μετά την αφαίρεση των απαιτούμενων φρεατίων, φυλάξτε τα υπόλοιπα φρεάτια/ταινίες σε κλειστή σακούλα με αποξηραντικό στους 2-8°C. Μόλις χρησιμοποιήσετε τα αντιδραστήρια, φυλάξτε τα πάλι στους 2-8°C.
2. Το έτοιμο για χρήση σύζευγμα και το διάλυμα υποστρώματος TMB είναι φωτοευαίσθητα και πρέπει να φυλάσσονται στο σκοτάδι. Το διάλυμα υποστρώματος θα πρέπει να απορριφθεί εάν αποκτήσει χρώμα λόγω διείσδυσης φωτός.
3. Λάβετε από το έτοιμο για χρήση σύζευγμα ή TMB μόνο την απαιτούμενη ποσότητα για την εκτέλεση της δοκιμασίας.

Υλικό	Κατάσταση	Αποθήκευση	Αντοχή
Δείγματα εξέτασης	αραιωμένο	+2 έως +8°C	μέγ. 6 ώρ.
	μη αραιωμένο	+2 έως +8°C	1 εβδομάδα
Μάρτυρες	μετά το άνοιγμα	+2 έως +8°C	3 μήνες
Πλάκα μικροτιτλοδότησης	μετά το άνοιγμα	+2 έως +8° (φύλαξη στον παρεχόμενο σάκκο με αφυγραντικό μέσο)	3 μήνες
Απορροφητικό ρευματοειδούς παράγοντα	μη αραιωμένο, μετά το άνοιγμα	+2 έως +8°C	3 μήνες
	αραιωμένο	+2 έως +8°C	1 εβδομάδα
Σύζευγμα	μετά το άνοιγμα	+2 έως +8°C (προστατευμένο από το φως)	3 μήνες
Τετραμεθυλβενζιδίνη (TMB)	μετά το άνοιγμα	+2 έως +8°C (προστατευμένο από το φως)	3 μήνες
Ανασχετικό διάλυμα	μετά το άνοιγμα	+2 έως +8°C	3 μήνες
Διάλυμα πλύσης	μετά το άνοιγμα	+2 έως +8°C	3 μήνες
	πλήρως αραιωμένο (έτοιμο για χρήση)	+2 έως +25°C	4 εβδομάδες

5. Μέτρα προφύλαξης και προειδοποιητικές υποδείξεις

1. Ως οροί ελέγχου χρησιμοποιούνται μόνο οροί που ελέγχθηκαν και απέβησαν αρνητικοί για αντισώματα έναντι των ιών HIV1, HIV2, HCV και του επιφανειακού αντιγόνου ηπατίτιδας Β. Παρ' όλα αυτά, όλα τα δείγματα, τα αραιωμένα δείγματα, οι οροί ελέγχου, τα συζεύγματα και οι ταινίες μικροτιτλοδότησης θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά μολυσματικά υλικά και ο χειρισμός τους θα πρέπει να είναι προσεκτικός. Ισχύουν οι εκάστοτε κατευθυντήριες οδηγίες εργαστηριακών εργασιών.
2. Τα συστατικά που περιέχουν συντηρητικό, ανασχετικό διάλυμα κιτρικού άλατος και TMB είναι ερεθιστικά για το δέρμα, τα μάτια και τους βλεννογόνους. Σε περίπτωση επαφής, εκπλύνετε αμέσως με τρεχούμενο νερό και αναζητήστε ενδεχομένως ιατρική βοήθεια.
3. Τα χρησιμοποιημένα υλικά απορρίπτονται σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της εκάστοτε χώρας.

6. Επιπλέον απαιτούμενα υλικά (δεν παρέχονται)

1. Απεσταγμένο/απιονισμένο νερό
2. Πολυκάναλη πιπέτα 50μl, 100μl
3. Μικροπιπέτες: 10μl, 100μl, 1000μl
4. Φιαλίδια αντίδρασης
5. Φύλλα χαρτοβάμβακα
6. Καλύμματα πλακών ELISA
7. Περιέκτης μολυσματικών αποβλήτων
8. Συσκευή πλύσης πλακών μικροτιτλοδότησης ELISA, χειρός ή αυτόματη
9. Φασματοφωτόμετρο για πλάκες μικροτιτλοδότησης με φίλτρο 450/620nm (μήκος κύματος αναφοράς 620-690nm)
10. Θάλαμος επώασης

7. Εκτέλεση δοκιμασίας

Η πιστή τήρηση των οδηγιών εργασίας της VIROTECH Diagnostics αποτελεί προϋπόθεση για τη λήψη ορθών αποτελεσμάτων.

7.1 Υλικό εξέτασης

Ως υλικό εξέτασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ορός και πλάσμα (στη συγκεκριμένη περίπτωση, το είδος των αντιπηκτικών δεν είναι σημαντικό), εάν και σε αυτό το ένθετο συσκευασίας αναφέρεται μόνο ορός.

Πραγματοποιείτε πάντα φρέσκιες αραιώσεις ασθενούς.

Εάν επιθυμείτε να τις διατηρήσετε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα θα πρέπει να τις καταψύξετε. Αποφύγετε επανειλημμένη απόψυξή τους.

1. Χρησιμοποιείτε μόνο φρέσκους ορούς που δεν έχουν αδρανοποιηθεί.
2. Μη χρησιμοποιείτε υπερλιπιδαιμικά, αιμολυμένα, μικροβιακά μολυσμένα δείγματα και θολερούς ορούς (ψευδώς θετικά/αρνητικά αποτελέσματα).

7.2 Προετοιμασία των αντιδραστηρίων

Το διαγνωστικό σύστημα της VIROTECH Diagnostics παρέχει μεγάλη ευελιξία, εφόσον τα ρυθμιστικά διαλύματα αραιώσης και πλύσης, το TMB, το ανασχετικό διάλυμα κιτρικού άλατος και το σύζευγμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για κάθε παράμετρο και με οποιαδήποτε παρτίδα. Οι έτοιμοι για χρήση οροί ελέγχου (θετικός ορός ελέγχου, ορός ελέγχου αποκλεισμού, αρνητικός ορός ελέγχου) είναι ειδικό για την εκάστοτε παράμετρο και πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο μαζί με την παρτίδα πλακών που αναφέρεται στο πιστοποιητικό ελέγχου ποιότητας.

1. Ρυθμίστε το θάλαμο επώασης στους 37°C και επιβεβαιώστε την επίτευξη αυτής της θερμοκρασίας πριν ξεκινήσετε την επώαση.
2. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου. Μόνο τότε ανοίξετε τη συσκευασία με τις ταινίες ελέγχου.
3. Πριν από τη χρήση, ανακινήστε καλά όλα τα συστατικά σε υγρή μορφή.
4. Γεμίστε το συμπύκνωμα διαλύματος πλύσης μέχρι το 1 λίτρο με απεσταγμένο/απιονισμένο νερό (σε περίπτωση ενδεχόμενης κρυσταλλοποίησης του συμπυκνώματος, φέρετε το σε θερμοκρασία δωματίου πριν την αραιώση και ανακινήστε το καλά πριν τη χρήση).
5. Υψηλοί τίτλοι IgG ή ρευματοειδούς παράγοντα ενδέχεται να διαταράζουν την ειδική ανίχνευση IgM αντισωμάτων και να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. **Ο ορός υποβάλλεται σε προεπεξεργασία με RF-SorboTech** (απορροφητικό μέσο VIROTECH). Για τους ορούς ελέγχου IgM δεν απαιτείται προκαταρκτική απορρόφηση.

7.3 Εκτέλεση δοκιμασίας VIROTECH ELISA

1. Για κάθε εκτέλεση της δοκιμασίας, διανείμετε με πιπέτα 100μl του έτοιμου για χρήση ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσης (τυφλό δείγμα), του αρνητικού ορού ελέγχου, του ορού ελέγχου αποκλεισμού και του θετικού ορού ελέγχου IgG και IgM καθώς και των αραιωμένων ορών ασθενούς. Συνιστούμε τη διπλή εκτέλεση της δοκιμασίας (τυφλό δείγμα, οροί ελέγχου και οροί ασθενούς). Η διπλή εκτέλεση του ορού ελέγχου αποκλεισμού είναι απολύτως αναγκαία. Αραίωση εργασίας των ορών ασθενούς: 1+100 – π.χ. 10μl ορού + 1ml ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσης.
2. Μετά τη διανομή με πιπέτα ακολουθεί η επώαση για 30 min στους 37 °C (με κάλυμμα).
3. Η περίοδος επώασης τερματίζεται με 4 πλύσεις, χρησιμοποιώντας 350-400μl διαλύματος πλύσης ανά φρεάτιο για κάθε πλύση. Δεν θα πρέπει να παραμείνει διάλυμα πλύσης στα φρεάτια. Απομακρύνετε τα υπολείμματα υγρού κτυπώντας ελαφρά επάνω σε υπόθεμα χαρτοβάμβακα.
4. Διανείμετε με πιπέτα 100μl του έτοιμου για χρήση συζεύγματος σε όλα τα φρεάτια.
5. Επώαση των συζευγμάτων: 30 min στους 37°C (με κάλυμμα).
6. Η επώαση των συζευγμάτων τερματίζεται με 4 πλύσεις (βλ. σημείο 3).
7. Διανείμετε με πιπέτα 100μl του έτοιμου για χρήση διαλύματος υποστρώματος TMB σε κάθε φρεάτιο.
8. Επώαση του διαλύματος υποστρώματος: 30 λεπτά στους 37°C (καλυμμένο, σε σκοτεινό χώρο).
9. Ανάσχεση της αντίδρασης υποστρώματος: διανείμετε με πιπέτα 50μl του ανασχετικού διαλύματος κιτρικού άλατος σε κάθε φρεάτιο. Ανακινήστε την πλάκα προσεκτικά και σχολαστικά έως ότου αναμιχθούν πλήρως τα υγρά και διαπιστώσετε ομοιογενές κίτρινο χρώμα.
10. Μετρήστε τις απορροφήσεις στα 450/620nm (μήκος κύματος αναφοράς 620-690nm). Ρυθμίστε το φωτόμετρο με τρόπο που η απορρόφηση του τυφλού δείγματος να αφαιρείται από όλες τις υπόλοιπες απορροφήσεις. Η φωτομέτρηση θα πρέπει να εκτελείται εντός μίας ώρας από την προσθήκη του ανασχετικού διαλύματος.

Για τη σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας βλ. τελευταία σελίδα

7.4 Χρήση αναλυτών ELISA

Όλες οι δοκιμασίες ELISA της VIROTECH Diagnostics μπορούν να υποστούν επεξεργασία με επεξεργαστές ELISA. Ο χειριστής υποχρεούται να εκτελεί τακτικές βαθμονομήσεις της συσκευής.

Η VIROTECH Diagnostics συνιστά την εξής διαδικασία:

1. Σε εγκατάσταση της συσκευής ή εκτεταμένες επισκευές του αναλυτή ELISA, η VIROTECH Diagnostics συνιστά βαθμονόμηση της συσκευής σας σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή της συσκευής.
2. Ακολούθως συνιστάται ο έλεγχος του επεξεργαστή ELISA με το kit επαλήθευσης (EC250.00). Ο περιοδικός έλεγχος με το kit επαλήθευσης πρέπει να εκτελείται τουλάχιστον μία φορά κάθε τρίμηνο.
3. Σε κάθε εκτέλεση της δοκιμασίας θα πρέπει να πληρούνται τα κριτήρια έγκρισης του πιστοποιητικού ελέγχου ποιότητας του προϊόντος.

Η συγκεκριμένη διαδικασία διασφαλίζει την απρόσκοπτη λειτουργία του επεξεργαστή ELISA και εκτός αυτού συμβάλλει στη διασφάλιση της ποιότητας του εργαστηρίου.

8. Αξιολόγηση της δοκιμασίας

Οι έτοιμοι για χρήση οροί ελέγχου προορίζονται για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό ειδικών IgG και IgM αντισωμάτων, η συγκέντρωση των οποίων μετράται σε μονάδες VIROTECH (=VE). Αποκλίσεις οφειλόμενες στη διαδικασία της δοκιμασίας αντισταθμίζονται με τη μέθοδο υπολογισμού. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται υψηλό ποσοστό αναπαραγωγιμότητας. Για τον υπολογισμό των μονάδων VIROTECH χρησιμοποιούνται οι μέσοι όροι των τιμών οπτικής πυκνότητας (OD).

8.1 Έλεγχος λειτουργίας δοκιμασίας

α) Τιμές OD

Η τιμή OD του τυφλού δείγματος πρέπει να είναι μικρότερη του 0,15.

Οι τιμές OD των αρνητικών ορών ελέγχων πρέπει να υπολείπονται των τιμών OD που αναφέρονται στο πιστοποιητικό ελέγχου ποιότητας, ενώ οι τιμές OD των θετικών ορών ελέγχου και των ορών ελέγχου αποκλεισμού πρέπει να υπερβαίνουν τις τιμές OD που αναφέρονται στο πιστοποιητικό ελέγχου ποιότητας.

β) Μονάδες VIROTECH (VE)

Οι μονάδες VIROTECH (VE) των ορών ελέγχου αποκλεισμού ορίζονται με 10 VE. Οι υπολογισμένες μονάδες VE των θετικών ορών ελέγχου πρέπει να βρίσκονται εντός των ευρών που αναφέρει το πιστοποιητικό ελέγχου ποιότητας.

Η δοκιμασία θα πρέπει να επαναληφθεί εάν δεν πληρούνται οι απαιτήσεις (τιμές OD, μονάδες VE).

8.2 Υπολογισμός των μονάδων VIROTECH (VE)

Η απορρόφηση του μηδενικού δείγματος (450/620nm) πρέπει να αφαιρείται από όλες τις απορροφήσεις.

$$\begin{aligned} \text{VE (θετικός ορός ελέγχου)} &= \frac{\text{OD (θετικός ορός ελέγχου)}}{\text{OD (ορός ελέγχου αποκλεισμού)}} \times 10 \\ \text{VE (ορός ασθενούς)} &= \frac{\text{OD (ορός ασθενούς)}}{\text{OD (ορός ελέγχου αποκλεισμού)}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Πίνακας αξιολόγησης IgG και IgM

Αποτέλεσμα (VE)	Αξιολόγηση
< 9,0	αρνητικό
9,0 – 11,0	οριακό
> 11,0	θετικό

1. Εάν οι μετρημένες μονάδες VE του δείγματος υπερβαίνουν το οριακό εύρος, τα δείγματα θεωρούνται θετικά.
2. Εάν οι μετρημένες μονάδες VE βρίσκονται εντός του αναφερόμενου οριακού εύρους, δεν υπάρχει σημαντικά υψηλή συγκέντρωση αντισωμάτων και τα δείγματα θεωρούνται οριακά. Για την ασφαλή ανίχνευση λοίμωξης θα πρέπει να καθοριστεί η συγκέντρωση αντισωμάτων σε 2 δείγματα ορού. Ένα δείγμα ορού θα πρέπει να ελεγχθεί αμέσως μετά την έναρξη της λοίμωξης και ένα δεύτερο μετά από 5-10 ημέρες (λήψη ορού κατά τη φάση ανάρρωσης). Η συγκέντρωση

αντισωμάτων των δύο δειγμάτων πρέπει να καθοριστεί ταυτόχρονα, δηλ. σε μία εκτέλεση της δοκιμασίας. Για την ορθή διάγνωση δεν αρκεί η αξιολόγηση ενός και μόνο δείγματος ορού.

- Εάν οι μετρημένες τιμές βρίσκονται κάτω από το καθορισμένο οριακό εύρος, το δείγμα δεν περιέχει μετρήσιμα, ειδικά για το αντιγόνο αντισώματα. Τα δείγματα θεωρούνται αρνητικά

8.4 Σημασία των αντιγόνων

Αντιγόνο / Περιγραφή	Σημασία των αντιγόνων	Ειδικότητα των αντισωμάτων
EBNA1	Αρχικά του Epstein-Barr Nuclear Antigen (πυρηνικό αντιγόνο Epstein-Barr), μίας ιικής πρωτεΐνης που εκφράζεται στον πυρήνα κυττάρων με λανθάνουσα λοίμωξη. Τα IgG αντισώματα έναντι της EBNA1 αποτελούν ασφαλείς δείκτες παρελθούσας λοίμωξης με τον EBV. Σε σπάνιες περιπτώσεις απουσιάζει η IgG ανοσοαπόκριση έναντι της EBNA1 (πρωτογενής ή δευτερογενής). Σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, οι τίτλοι των IgG αντισωμάτων έναντι της EBNA1 ενδέχεται να μειωθούν δραστικά (δευτερογενής απώλεια EBNA1).	IgG: Κύριος δείκτης υψηλής ειδικότητας για <u>παρελθούσα</u> λοίμωξη με EBV.
VCA	Έχουν περιγραφεί διάφορα " Virus Capsid Antigens " (καψιδικά αντιγόνα). Μεταξύ αυτών, ανοσολογικά επικρατούσες θεωρούνται οι πρωτεΐνες gp125 και p18. Τα IgM αντισώματα έναντι των αντιγόνων VCA-gp125/p18 εξαφανίζονται συνήθως ορισμένες εβδομάδες μετά τη λοίμωξη, ενώ αντίθετα τα IgG αντισώματα έναντι των αντιγόνων VCA-gp125/p18 παραμένουν εφ'όρου ζωής. Σε περίπτωση επανενεργοποίησης του ιού, παράγονται ενίοτε νέα IgM αντισώματα κατά των αντιγόνων VCA-gp125/p18.	IgG: γενικός δείκτης λοιμώξεων με EBV, υψηλής ειδικότητας IgM: υψηλής ειδικότητας για <u>πρωτογενή λοίμωξη με</u> EBV
EA-D	Το " Early Antigen-Diffuse " (πρώιμο διάχυτο αντιγόνο) ανήκει στα πρώιμα αντιγόνα που συντίθενται κατά τον αναπαραγωγικό κύκλο του ιού (ενεργή φάση λοίμωξης). Τα IgG και IgM αντισώματα έναντι του αντιγόνου EA-D, με ταυτόχρονα αρνητικό EBNA-IgG, ανευρίσκονται τυπικά σε πρωτογενείς λοιμώξεις. Στη φάση ανάρρωσης μειώνεται η συγκέντρωση των IgG αντισωμάτων κατά του αντιγόνου EA-D, μπορεί ωστόσο να ανέλθει δραστικά σε περίπτωση επανενεργοποίησης του ιού EBV. Αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης των αντισωμάτων δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με την κλινική σημασία μίας επανενεργοποίησης του EBV	IgG: 1.) ειδικό για <u>πρωτογενείς</u> <u>λοιμώξεις</u> με EBV 2.) ορολογικός δείκτης επανενεργοποίησης του EBV

8.5 Πίνακας ερμηνείας

Αξιολόγηση	IgM	IgG		
		EBNA1	VCA	EA-D
Οροαρνητικότητα	αρν.	αρν.	αρν.	αρν.
ένδειξη Πρωτογενής λοίμωξη	θετ./αρν.	αρν.	θετ./αρν.	θετ./αρν.
ένδειξη Παρελθούσα λοίμωξη	αρν.	θετ./αρν.	θετ./αρν.	αρν./θετ.

θετ./αρν.: κατά κανόνα θετικό

αρν./θετ.: κατά κανόνα αρνητικό

Εφαρμογή του διαγνωστικού συντελεστή:

Κάτω από ορισμένες συνθήκες, τα VCA IgM αντισώματα μπορούν να παραμένουν ακόμη και σε περίπτωση υπάρχουσας IgG ανοσοαπόκρισης έναντι της EBNA1.

Σε αυτές τις ασαφείς περιπτώσεις, όταν και οι δύο δείκτες υψηλής ειδικότητας είναι θετικοί, δηλ. το EBNA1 IgG για παρελθούσες λοιμώξεις και το VCA IgM για πρωτογενείς λοιμώξεις, βοηθά ο **διαγνωστικός συντελεστής 1,5** για τη θέση σαφούς διάγνωσης. Οι τιμές (σε μονάδες VIROTECH-VE) των EBNA1 IgG και VCA IgM συγκρίνονται και η παράμετρος που υπερβαίνει την άλλη κατά τουλάχιστον 1,5 φορά, είναι και αυτή που θέτει τη διάγνωση.

Εάν τα EBNA1 IgG και VCA IgM είναι θετικά, ισχύουν τα εξής:

- Τιμή VE του **EBNA1 IgG** $\geq$ **1,5x** τιμής VE του **VCA IgM** $\Rightarrow$ **παρελθούσα λοίμωξη**
- Τιμή VE του **VCA IgM** $\geq$ **1,5x** τιμής VE του **EBNA1 IgG** $\Rightarrow$ **πρωτογενής λοίμωξη**

Παράδειγμα: VCA IgM: 25VE και EBNA1 IgG: 15VE

Τιμή VE του **VCA IgM: 25VE** $\geq$ **1,5x** τιμής 15VE του **EBNA1 IgG 22,5VE**
VCA IgM: 25VE $\geq$ **EBNA1 IgG: 22,5VE** $\Rightarrow$ **πρωτογενής λοίμωξη**

Εφόσον το VCA IgM υπερβαίνει το EBNA1 IgG κατά τουλάχιστον 1,5 φορά, μπορεί να τεθεί με ασφάλεια η διάγνωση μίας πρωτογενούς λοίμωξης.

8.6 Περιορισμοί της δοκιμασίας

1. Για την ερμηνεία αποτελεσμάτων ορολογικών εξετάσεων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η κλινική εικόνα, τα επιδημιολογικά στοιχεία και άλλα, τυχόν διαθέσιμα αποτελέσματα εργαστηριακών εξετάσεων
2. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα ELISA δεν αποκλείει απολύτως το ενδεχόμενο λοίμωξης με τον EBV.
3. Στη διαφοροδιάγνωση θα πρέπει να συμπεριληφθούν λοιμώξεις από παθογόνους μικροοργανισμούς με παρόμοια κλινική εικόνα.
4. Ο ιός Epstein Barr παρουσιάζει γνωστές διασταυρούμενες αντιδράσεις με ιούς της οικογένειας των ερπητοϊών. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος IgM θα πρέπει να αποκλειστούν διασταυρούμενες αντιδράσεις, κυρίως με τον κυτταρομεγαλοϊό (CMV).
5. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα IgM δεν αποκλείει το ενδεχόμενο πρωτογενούς λοίμωξης, διότι σε ορισμένες πρωτογενείς λοιμώξεις δεν συντίθεται IgM (IgM μη ανταποκρινόμενοι ασθενείς) (7).
6. Στην έναρξη μίας πρωτογενούς λοίμωξης, όλες οι ορολογικές παράμετροι ενδέχεται να είναι αρνητικές. Σε κλινική υποψία λοίμωξης με τον EBV και οροαρνητικά αποτελέσματα θα πρέπει να διενεργηθεί δεύτερη αιμοληψία.
7. Ένα αρνητικό αντι-EBNA1 δεν αποτελεί υποχρεωτικά ένδειξη πρωτογενούς λοίμωξης. Ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς ενδέχεται να παρουσιάσουν δευτερογενής απώλεια του αντι-EBNA1. Σε 5% των προσβεβλημένων με τον EBV (μη ανταποκρινόμενοι στην EBNA1) δεν συντίθεται αντι-EBNA1 (7).
8. Μια ακριβής ερμηνεία της λοίμωξης από EBV θα πρέπει να βασίζεται στα αποτελέσματα των αντισωμάτων κατά των αντιγόνων-οδηγών VCA IgG, VCA IgM και EBNA1 IgG μέσω ELISA, Western Blot ή Immunoblot. Τα EA-D IgG μπορούν να παρέχουν πρόσθετες πληροφορίες για τις πρωτογενείς λοιμώξεις και την ορολογική επανενεργοποίηση.
9. Αντισώματα που μεταγγίστηκαν παθητικά, λίγο πριν τη δοκιμασία, μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα των ορολογικών εξετάσεων για EBV. Αυτό ισχύει π.χ. σε μεταγγίσεις αίματος ή σε μεταφορά αντισωμάτων της μητέρας στο βρέφος.
10. Οι ορολογικές εξετάσεις για EBV δεν παρέχουν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με την κλινική σημασία μίας επανενεργοποίησης (11)

9. Βιβλιογραφία

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-monomucleosis-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

Προετοιμασία δειγμάτων ασθενούς και διαλύματος πλύσης

▼ **Διάλυμα πλύσης:** Συμπλήρωση συμπυκνώματος με απιον./απεστ. νερό έως το 1 λίτρο

▼ **Αραίωση Δείγματα IgG**
1:101

π.χ.:
10 μl ορού/πλάσμα + 1000 μl ρυθμιστικού διαλύματος
αραίωσης
(το ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης είναι έτοιμο για χρήση)

▼ **Αραίωση Δείγματα IgM**
1:101

**Απορρόφηση ρευματοειδών παραγόντων
με RF-SorboTech**

π.χ.:
5 μl ορού/πλάσμα + 450 μl ρυθμιστικού διαλύματος
αραίωσης +
1 σταγόνα RF-SorboTech: επώαση σε θερμ. δωματίου για
15 min

Εκτέλεση δοκιμασίας

