

## **VIROTECH EBV IgG LINE Immunoblot**

**(EBV IgG LINE-32)**

**Bestell-Nr.: WE102G32**

**(EBV IgG LINE-96)**

**Bestell-Nr.: WE102G96**

## **VIROTECH EBV IgM LINE Immunoblot**

**(EBV IgM LINE-32)**

**Bestell-Nr.: WE102M32**

**(EBV IgM LINE-96)**

**Bestell-Nr.: WE102M96**

**NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK**

**VIROTECH Diagnostics GmbH  
Löwenplatz 5  
D- 65428 Rüsselsheim  
Tel.: +49-6142-6909-0  
Fax: +49-6142-966613  
<http://www.virotechdiagnostics.com>**



Freigabedatum: 25.10.2018

REV 23 / VIROTECH EBV IgG/IgM LINE Immunoblot DE

# Inhalt

<b>1. Verwendungszweck</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Diagnostische Bedeutung</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Testprinzip</b> .....	<b>3</b>
<b>4. Packungsinhalt</b> .....	<b>3</b>
4.1 Kit für 32 Bestimmungen.....	3
4.2 Kit für 96 Bestimmungen.....	4
<b>5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien</b> .....	<b>4</b>
<b>6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise</b> .....	<b>4</b>
<b>7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)</b> .....	<b>5</b>
<b>8. Untersuchungsmaterial</b> .....	<b>5</b>
<b>9. Testdurchführung</b> .....	<b>5</b>
9.1 Vorbereitung der Proben.....	5
9.2 Vorbereitung der Reagenzien.....	5
9.3 Immunoblot Testdurchführung.....	6
9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren.....	7
<b>10. Testauswertung</b> .....	<b>7</b>
10.1 Auswertung der Patientenproben.....	7
10.2 Einsatz der Cut off Kontrolle.....	7
10.3 Bedeutung der Antigene.....	7
10.4 Auswertungskriterien.....	8
10.5 Grenzen des Tests.....	9
<b>11. Leistungsdaten</b> .....	<b>9</b>
11.1 Sensitivität.....	9
11.2 Spezifität.....	10
11.3 Diagnostische Sensitivität.....	10
11.4 Diagnostische Spezifität.....	11
11.5 Kreuzreaktivität.....	11
11.6 Durchseuchung (Erwartete Werte).....	11
11.7 Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit).....	11
11.8 Inter-Assay-Präzision (Reproduzierbarkeit).....	11
<b>12. Literatur</b> .....	<b>11</b>
<b>13. Testablaufschemata</b> .....	<b>13</b>

## 1. Verwendungszweck

---

LINE Immunoblot zum qualitativen Nachweis von Epstein Barr Virus (EBV) spezifischen IgG- bzw. IgM- Antikörpern im Humanserum. Der Kit kann bei einer erweiterten EBV-Diagnostik zur Differenzierung bzw. Absicherung von Seronegativität, Primärinfektion und abgelaufener Infektion eingesetzt werden.

## 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 differentialdiagnostische Aufgabe der EBV-Serologie besteht in der Abgrenzung zu klinisch ähnlich 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

---

Proteine des Erreger-Antigens werden durch ein spezielles Sprühverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Nitrozellulosemembran wird dann in Einzelstreifen geschnitten.

Die Inkubation der antigentragenden Nitrozellulosestreifen mit Humanserum/-plasma-Proben erlaubt den Nachweis vorhandener spezifischer Antikörper. Diese Antikörper bilden Immunkomplexe mit dem auf den Teststreifen fixierten Antigenen. Nach Entfernung der nicht gebundenen Antikörper durch Waschschriffe, werden die einzelnen Nitrozellulosestreifen mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-human IgG- bzw. IgM- Antikörpern inkubiert. Nachdem nicht gebundene konjugierte Antikörper durch einen weiteren Waschschriffe entfernt wurden, erfolgt die Sichtbarmachung der Antigen/Antikörper-Komplexe (der gebundenen Antikörper) durch die Zugabe eines ungefärbten Substrates, welches bei seiner enzymatischen Umsetzung blauviolette Banden (%Antigen-Banden-) erzeugt. Die Enzym/Substrat-Reaktion wird durch Waschen der Nitrozellulosestreifen mit Aqua dest./deionisiert gestoppt. Abhängig von dem beobachteten Bandenmuster kann man auf das Vorhandensein von spezifischen IgG- bzw. IgM-Antikörpern schließen.

## 4. Packungsinhalt

---

### 4.1 Kit für 32 Bestimmungen

- |   |           |             |
|---|-----------|-------------|
| 1. <b>IgG bzw. IgM Nitrozellulose Teststreifen</b> mit aufgespritzten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig | <b>1x</b> | 32 Streifen |
| 2. <b>IgG bzw. IgM Cut off Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt</b>   | <b>1x</b> | 1,0 ml      |
| 3. <b>Verdünnungs-/Waschpuffer</b> , pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel  | <b>2x</b> | 50 ml       |
| 4. <b>IgG- bzw. IgM- Konjugat</b> (100x konz.)<br>Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel                  | <b>1x</b> | 0,7 ml      |
| 5. <b>Substrat</b> (BCIP/NBT), gebrauchsfertig  | <b>1x</b> | 57 ml       |
| 6. <b>Auswertungsprotokollblatt</b> zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse   | <b>1x</b> | 1 Stk.      |

## 4.2 Kit für 96 Bestimmungen

- |   |           |             |
|---|-----------|-------------|
| 1. <b>IgG bzw. IgM Nitrozellulose Teststreifen</b> mit aufgespritzten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig | <b>3x</b> | 32 Streifen |
| 2. <b>IgG bzw. IgM Cut off Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt</b>   | <b>2x</b> | 1,0 ml      |
| 3. <b>Verdünnungs-/Waschpuffer</b> , pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel  | <b>4x</b> | 50 ml       |
| 4. <b>IgG- bzw. IgM- Konjugat</b> (100x konz.)<br>Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel                  | <b>3x</b> | 0,7 ml      |
| 5. <b>Substrat</b> (BCIP/NBT), gebrauchsfertig  | <b>3x</b> | 57 ml       |
| 6. <b>Auswertungsprotokollblatt</b> zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse   | <b>3x</b> | 1 Stk.      |

### Auf Anfrage zusätzlich erhältlich:

IgG bzw. IgM -Positive Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt, 0,5 ml.

Die positiven Banden > Cut off Bande können sie dem mitgelieferten Zertifikat entnehmen.

(Best.-Nr.: IgG: WE102P60 bzw. IgM: WE102P80)

IgG/IgM -Negative Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt, 0,5 ml.

Die negative Kontrolle zeigt keine Banden bzw. keine für die Auswertung relevanten Banden > Cut off Bande.

(Best.-Nr.: IgG/IgM: WE102N10)

## 5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien

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

- Die einzelnen Reagenzien nicht einfrieren und keinen hohen Temperaturen aussetzen.
- Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Lagerung der Reagenzien bei grellem Licht ist zu vermeiden.
- Die BCIP/ NBT-Substratlösung ist lichtempfindlich und muss im Dunkeln aufbewahrt werden.
- Nitrozellulose Teststreifen:** Streifen nach der Entnahme aus dem Beutel sofort verwenden. Beutel mit den nicht benötigten Streifen wieder fest verschließen und bei 2-8°C aufbewahren. Zur Archivierung der Ergebnisse sollten die Nitrozellulose Teststreifen unbedingt vor direktem Sonnenlicht geschützt werden, um ein Verblässen der Banden zu vermeiden.

Material	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Untersuchungsproben	unverdünnt	+2 bis +8°C	1 Woche
Teststreifen	nach Öffnen	+2 bis +8°C (Lagerung im mitgelieferten Beutel)	3 Monate
Kontrollen	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate
Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate
	verdünnt	+2 bis +8°C	ca. 6h
Substrat	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate
Waschlösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +8°C	4 Wochen
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	oder Raumtemperatur	2 Wochen

## 6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

- 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 Kontrollseren, Proben, verdünnte Proben, Konjugate und die Nitrozellulose Teststreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
- Bei der Durchführung des Immunoblots sind Einmalhandschuhe zu tragen und eine Plastik-Pinzette zu benutzen.
- Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.

- Die Inkubationswannen sind vom Hersteller nur für den Einmalgebrauch konzipiert. Ein mehrmaliger Gebrauch der Inkubationswannen liegt in der Verantwortung des Anwenders. Bei evtl. Mehrfachverwendung empfehlen wir, die Inkubationswannen nach Gebrauch mehrere Stunden in 1% Natriumhypochloritlösung zu desinfizieren, zu reinigen und gründlich mit Leitungswasser und Aqua dest./deionisiert zu spülen.

## **7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)**

---

- Inkubationswanne (bei Bedarf erhältlich unter Best.-Nr. WE300.08)
- Schüttler (vertikal nicht zentrifugal)
- Eine Spritzflasche zum Abstopfen
- Pipette oder Handwaschgerät
- Mikropipetten 5 µl - 1500 µl
- Pipettenspitzen
- Probenröhrchen (Tubes) 2-20 ml Volumen
- Plastikpinzette
- Aqua dest. oder deionisiert
- Filterpapier

## **8. Untersuchungsmaterial**

---

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

## **9. Testdurchführung**

---

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für die Erzielung korrekter Ergebnisse.

### **9.1 Vorbereitung der Proben**

- Pro Patientenprobe werden 15 µl Serum oder Plasma benötigt.
- Blutproben sollten aseptisch durch Venenpunktion entnommen werden. Nach vollständiger Gerinnung ist das Serum abzutrennen (entfällt bei Plasma). Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren bei -20°C eingefroren werden.
- Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Seren ist zu vermeiden.
- Seren, die hitzeinaktiviert, lipämisch, hämolytisch oder mikrobiell kontaminiert sind, können zu verfälschten Ergebnissen führen und sollten daher nicht verwendet werden.
- Getrübe Serumproben (insbesondere nach dem Auftauen) nicht verwenden, ggf. zentrifugieren (5 min bei 1000 x g), klaren Überstand pipettieren und im Test einsetzen.

### **9.2 Vorbereitung der Reagenzien**

- Zur Anpassung an die Laborroutine, können alle LINEs und EcoBlots in einem Testlauf mit gleichen Inkubationszeiten und parameter- / chargenübergreifenden Komponenten abgearbeitet werden. Die Cut off Kontrollen werden parameter- und chargenspezifisch eingesetzt.
- Vor Verdünnung aller Testreagenzien das jeweilige Konzentrat auf Raumtemperatur bringen. Nur Aqua dest./deionisiert von hoher Qualität und Raumtemperatur verwenden.
- Verdünnungen vor Testansatz gut durchmischen.
- Verdünnungs-/Waschpuffer**

Der Verdünnungs-/ Waschpuffer liegt 10-fach konzentriert vor. Das Verdünnungs-/ Waschpufferkonzentrat 1:10 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen (10ml/50ml/100ml Konzentrat + 90ml/450ml/900ml A. dest./deionisiert), gut mischen.

Sowohl der konzentrierte als auch der verdünnte Verdünnungs-/ Waschpuffer können eventuell eine Gelbfärbung aufweisen. Diese Gelbfärbung hat weder Einfluss auf die Haltbarkeit des Verdünnungs-/ Waschpuffers, noch auf die Funktionalität und diagnostische Aussagekraft des Testansatzes.

5. **IgG bzw. -IgM-Konjugat**

Das Konjugat 1 + 100 mit endverdünntem Verdünnungs-/Waschpuffer verdünnen, gut mischen. Pro Serumprobe wird 1,5ml Konjugat-Gebrauchslösung benötigt. Siehe Konjugatverdünnungstabelle (Punkt: sTestablaufschema%).

6. **Substratlösung**

Die Substratlösung wird gebrauchsfertig geliefert.

### 9.3 Immunoblot Testdurchführung

**Achtung:** Die Nitrozellulose Teststreifen dürfen nur in der freigegebenen Ig-Klasse getestet werden (siehe Etikett auf dem Blotheftchen und Bezeichnung auf jedem einzelnen Teststreifen).

Für die korrekte Durchführung und Beurteilung des EBV LINEs, muß bei jedem Testansatz eine parameter- und chargenspezifische Cut off Kontrolle mitgeführt werden.

**Für eine sichere EBV Diagnostik sollte der LINE  
im IgG und IgM durchgeführt werden.**

1. Die Testdurchführung erfolgt bei Raumtemperatur.
2. Für jede Probe je 1 Streifen in die Rinne einer sauberen Inkubationswanne legen. Streifen möglichst nur am markierten oberen Ende anfassen.
3. Je 1,5ml gebrauchsfertigen **Verdünnungs-/Waschpuffer** pipettieren und auf den Schüttler stellen. Darauf achten, dass die Nitrozellulose Teststreifen gleichmäßig mit Flüssigkeit bedeckt sind, die Streifen dürfen während der gesamten Testdurchführung nicht trocknen.
4. Die verstärkten Nitrozellulose Teststreifen sind innerhalb einer Minute vollständig befeuchtet und können in Rücken-, Bauch- oder Seitenlage inkubiert werden.
5. Je **15µl Patientenserum/-plasma** bzw. **100µl der Cut off / Positiven / Negativen Kontrolle** zupipettieren, möglichst am oberen, markierten Streifenende. Patientenserum und Kontrolle **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Beim Pipettieren und anschließendem Abgießen darauf achten, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination der einzelnen Patientenproben kommt.
6. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen, oder vorsichtig abgießen. Beim Abgießen der Flüssigkeit bleiben die Nitrozellulose Teststreifen am Boden der Rinnen haften. Restflüssigkeit auf einem Saugpapier abtropfen.
7. Streifen **Waschen**: mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Vor Ablauf des letzten Waschschrilles die benötigte Menge an frischer Konjugatverdünnung (s. Tabelle) herstellen.
8. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
9. Je 1,5 ml der hergestellten **Konjugatverdünnung** in die entsprechenden Inkubationsrinnen pipettieren und **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren.
10. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen.
11. Streifen **Waschen**: mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Anschließend **1 x 1 Minute** mit **Aqua dest./deionisiert** spülen.
12. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
13. Je 1,5 ml gebrauchsfertige **Substratlösung** in die Rinnen pipettieren und **10 ± 3 Minuten** auf dem Schüttler entwickeln.
14. Farbentwicklung **stoppen** durch Abgießen der Substratlösung. Anschließend Streifen ohne Zwischeninkubation **3 x** mit je 1,5 ml **Aqua dest./deionisiert** waschen.
15. Aqua dest./deionisiert abgießen und Streifen auf einem sauberen saugfähigen Papier trocknen. Die Hintergrundfärbung, die bei feuchten Nitrozellulose Teststreifen beobachtet werden kann, geht bei den getrockneten Streifen vollständig zurück. Verstärkte Nitrozellulose Teststreifen benötigen im Vergleich zu den herkömmlichen Nitrozellulose Teststreifen etwas länger, bis sie getrocknet sind.
16. Zur Auswertung das beigefügte Auswertungsprotokoll verwenden. Die Beschriftung der hochspezifischen Banden auf dem Protokollblatt erleichtert Ihnen die Auswertung der Patientenproben.



<b>VCA-p18</b>	Siehe auch die Erläuterungen unter <b>Bedeutung</b> bei VCA-gp125. Das p18-Peptid ist in der IgM-Serologie ein hochspezifischer Marker für Primärinfektionen. Bei Primärinfektionen findet sich i.d.R. zunächst eine deutliche anti-p18 IgM-Antikörperantwort, gefolgt von einem Anstieg der anti-p18 IgG-Antikörper. Dieser IgG-Anstieg erreicht sein Maximum wenn die IgM-Titer fallen und vor dem Auftreten eine IgG-Immunantwort gegen EBNA1.	<b>IgG-p18:</b> hochspezifischer Marker für den Kontakt mit EBV im fortgeschrittenen Stadium  <b>IgM:</b> hochspezifisch für eine EBV- <u>Primärinfektion</u>
<b>EA-D</b>	<b>Early Antigen-Diffuse</b> 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.	<b>IgG:</b> <b>1.)</b> spezifisch für EBV- <u>Primärinfektionen</u> <b>2.)</b> serologischer Marker für eine EBV-Reaktivierung  <b>IgM:</b> spezifisch für EBV- <u>Primärinfektionen</u>

#### 10.4 Auswertungskriterien

Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.

#### Empfohlene IgM-Beurteilung

Bande(n)	Bewertung	Beurteilung
<b>keine Bande</b> oder Bande(n) < Cut-off-Bande	negativ	Keine IgM-Antikörper gegen EBV-Antigene nachweisbar.
<b>gp125</b> ≥ Cut-off-Bande (p18)	positiv	Hinweis auf eine <u>Primärinfektion</u> , insbesondere bei fehlender IgG-Immunantwort gegen EBNA1 (s. auch IgG-Beurteilung für EBNA1)
<b>p18</b> ≥ Cut-off-Bande (p18)	positiv	Hinweis auf eine <u>Primärinfektion</u> , insbesondere bei fehlender IgG-Immunantwort gegen EBNA1 (s. auch IgG-Beurteilung für EBNA1)
<b>EA-D isoliert reaktiv</b> ≥ Cut-off-Bande (p18)	negativ	IgM-Antikörper gegen EA-D werden <u>häufig bei Primärinfektionen</u> gebildet, treten aber immer zusammen mit IgM-Antikörpern gegen p18 und/oder gp125 auf und werden aus diesem Grund nicht in der Beurteilung berücksichtigt.

#### Empfohlene IgG-Beurteilung bei einer negative IgM Beurteilung

IgM Beurteilung	Auftretende Bande(n) im IgG <sup>-</sup> Cut off Bande				IgG-Beurteilung	Beispieltext Befund
	EBNA1	gp125	p18	EA-D		
	EBNA1 Cut off Bande	p18 Cut off Bande	p18 Cut off Bande	p18 Cut off Bande		
Negativ	neg.	neg.	neg.	neg.	Negativ	Kein Antikörper gegen EBV Antigen nachweisbar

	pos.	neg./pos.	neg./pos.	neg./pos.	Positiv	Hinweis auf eine abgelaufene EBV-Infektion
	neg.	pos.	pos.	neg./pos.	Positiv	Hinweis auf eine abgelaufene EBV-Infektion
	neg.	pos.	neg.	neg.	Positiv	Hinweis auf einen Kontakt mit EBV. Eine Unterscheidung zwischen Primär- und abgelaufener Infektion ist nicht möglich. Kontrolle empfohlen
	neg.	neg.	pos.	neg.	Positiv	Hinweis auf eine abgelaufene EBV-Infektion. Kontrolle empfohlen
	neg.	neg.	neg.	pos.	Positiv	Hinweis auf Kontakt mit EBV. Kontrolle dringend empfohlen.
	neg.	pos.	neg.	pos.	Positiv	Verdacht auf eine EBV-Primärinfektion. Kontrolle dringend empfohlen
	neg.	neg.	pos.	pos.	Positiv	Hinweis auf einen Kontakt mit EBV. Eine Unterscheidung zwischen Primär- und abgelaufener Infektion ist nicht möglich. Kontrolle empfohlen

#### Empfohlene IgG-Beurteilung bei einer positiven IgM Beurteilung

IgM Beurteilung	Auftretende Bande(n) im IgG - Cut off Bande				IgG-Beurteilung	Beispieltext Befund
	EBNA1	gp125	p18	EA-D		
Positiv	neg.	neg.	neg.	neg.	Negativ	Hinweis auf eine Primärinfektion
	pos.	neg./pos.	neg./pos.	neg./pos.	Positiv	Hinweis auf eine abgelaufene EBV-Infektion
	neg.	pos.	neg./pos.	neg./pos.	Positiv	Hinweis auf Primärinfektion
	neg.	neg./pos.	pos.	neg./pos.	Positiv	Hinweis auf Primärinfektion
	neg.	neg./pos.	neg./pos.	pos.	Positiv	Hinweis auf Primärinfektion

#### 10.5 Grenzen des Tests

1. Ein negatives Blotergebnis schließt die Möglichkeit einer Infektion mit EBV nicht vollständig aus.
2. In seltenen Fällen können Patientenserum %inverse+Banden zeigen (dunkler Hintergrund, weiße Banden); diese sind nicht zu bewerten, d.h. der Immunoblot ist in diesen Fällen nicht auswertbar. Das Serum sollte mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.
3. Die EBV-Serologie alleine lässt keine sichere Aussage über die klinische Relevanz einer Reaktivierung zu (9).
4. 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).
5. Ein negativer VCA-IgM Befund schließt die Möglichkeit einer Primärinfektion nicht aus, da in manchen Fällen einer akuten Infektion kein VCA-IgM gebildet wird (IgM-nonresponder) (7).
6. 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.

#### 11. Leistungsdaten

##### 11.1 Sensitivität

Die Ermittlung der Sensitivität basiert auf der Untersuchung von Seren:

1. von Patienten mit EBV-Primärinfektionen (n=10; Serenquelle: Ringversuchseren und PanBio, Australien)
2. von Spendern mit durchgemachter EBV-Infektion (n=40; Serenquelle: Dr. Gärtner, Homburg/Saar).

Als Referenzmethoden (Befund) wurden ELISAs und/oder IFTs durchgeführt.

Serenkollektiv (n=50)		LINE IgG + IgM Gesamtbefund	
		Primärinfektion	Abgelaufene Infektion
Befund	Primärinfektion	10	0
	Abgelaufene Infektion	0	40

Die Befunde des EBV-LINE stimmten in allen Fällen mit denen der Referenzteste überein.

### 11.2 Spezifität

Zur Ermittlung der Spezifität wurden folgende Serenkollektive untersucht:

1. Schwangere (n=15)
2. Kinder (n=10)
3. EBV-Seronegative (n=20; Serenquelle: Dr. Gärtner, Homburg/Saar)

Als Referenzmethoden (Befund) wurden ELISAs und/oder IFTs durchgeführt.

(*) Serenkollektiv (n=45)		LINE IgG + IgM Gesamtbefund	
		Abgelaufene Infektion	Seronegativ
Befund	Abgelaufene Infektion	19	0
	Seronegativ	0	25

(\*) Bei einem Kinderserum konnte kein Vergleich vorgenommen werden, da der ELISA hier keinen eindeutigen serologischen Befund ergab. Dieser unklare Befund wurde bei der Berechnungen der Spezifität nicht berücksichtigt.

Die Befunde des EBV-LINE stimmten in allen Fällen mit denen der Referenzteste überein.

### 11.3 Diagnostische Sensitivität

Die Bewertung der diagnostischen Sensitivität basierte auf klinisch charakterisierten Seren von Patienten mit EBV-Primärinfektionen (n=30) und abgelaufenen Infektionen (n=36) (Serenquelle: Dr. Gärtner, Homburg/Saar).

Serenkollektiv (n=66)		LINE IgG + IgM Gesamtbefund	
		Primärinfektion	Abgelaufene Infektion
Diagnostischer Befund	Primärinfektion (*)	29	0
	Abgelaufene Infektion	0	36

(\*) Ein unklarer Befund wurde bei der Berechnungen der diagnostischen Sensitivität nicht berücksichtigt. Es handelt sich um ein Serum von einem einjährigen Kind mit einer Sichelzellenanämie, das eine Bluttransfusion erhalten hatte. Dieses Serum wurde mit dem LINE als abgelaufene Infektion befundet und reagierte auch im Referenz-IFT mit EBNA1 grenzwertig.

Aus der obigen Tabellen ist ersichtlich, daß im Gesamtbefund alle klinisch definierten Seren (mit Ausnahme des o.a. unklaren Befundes) erkannt wurden.

#### 11.4 Diagnostische Spezifität

Die Bewertung der diagnostischen Spezifität basierte auf 20 seronegative Seren (Serenquelle: Dr. Gärtner, Homburg/Saar).

Serenkollektiv (n=20)		LINE IgG + IgM Gesamtbefund	
		Neg.	Pos.
Diagnostischer Befund	Neg.	20	0
	Pos.	0	0

#### 11.5 Kreuzreaktivität

Die Untersuchung der Kreuzreaktivität erfolgte anhand 47 Seren von Patienten:

1. mit einer CMV-Infektion (n=20; Serenquelle: Dr. Gärtner, Homburg/Saar)
2. einer Erkrankung aus dem rheumatischen Umfeld (n= 20; Serenquelle: Dr. Gärtner, Homburg/Saar)
3. einer Autoimmunerkrankung, ANF-positiv (n=7; Serenquelle: Dr. Schäfer, Heidelberg)

Als Referenztest wurde bei 1. und 2. ein IFT eingesetzt und bei 3. die ELISAs: EBNA1-IgG, VCA-IgM, VCA-IgG und EA-D.

Die Befunde des EBV-LINE stimmten in allen Fällen mit denen der Referenzteste überein und es konnten keine Kreuzreaktivitäten festgestellt werden.

#### 11.6 Durchseuchung (Erwartete Werte)

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

Serenkollektiv (n=80)	LINE IgG + IgM Gesamtbefund
Abgelaufene Infektion	78
Seronegativ	2

#### 11.7 Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit)

Bei jeder Chargenfreigabe wird in der Qualitätskontrolle von jedem einzelnen Immunoblot ein Streifen mit einem bestimmten Humanserum im IgG und IgM getestet. Es findet somit eine 100% Kontrolle aller Immunoblots statt.

Die Intensitäten der Banden dürfen bei einer Skala von 1-5 maximal eine Intensitätsstufe vom Mittelwert abweichen.

#### 11.8 Inter-Assay-Präzision (Reproduzierbarkeit)

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden 3 Seren im IgG getestet. Die Bestimmung erfolgte in 10 verschiedenen Testansätzen von 3 Testpersonen. Ein Serum zeigt keine Antigenbanden, ein Serum alle Antigenbanden in hoher Intensität und ein Serum Banden mit schwachen Intensitäten.

In allen unabhängigen Testungen wurden die serologischen Vorgaben genau getroffen.

### 12. 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-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

### 13. Testablaufschemata

#### Testdurchführung in Kurzform:

Probeninkubation	<b>30 Minuten</b>	15 µl Patientenserum/-plasma / 100 µl Kontrolle in je 1,5 ml Verdünnungs- Waschpuffer
Waschen	<b>3 x 5 Minuten</b>	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Konjugatinkubation	<b>30 Minuten</b>	Mit 1,5 ml Gebrauchsverdünnung ( 1 + 100 )
Waschen	<b>3 x 5 Minuten 1 x 1 Minute</b>	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer Mit Aqua dest./deionisiert
Substratinkubation	<b>10 ± 3 Minuten</b>	Mit je 1,5 ml Substratlösung
Stoppen	<b>3 x ohne Zwischeninkubation</b>	Mit je 1,5 ml Aqua dest./deionisiert

#### Konjugatverdünnungstabelle: (gerundet)

<b>Anzahl Streifen</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Verdünnungs/ Waschpuffer</b>	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
<b>Konjugat-Konzentrat</b>	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
<b>Endvolumen</b>	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

<b>Anzahl Streifen</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
<b>Verdünnungs/ Waschpuffer</b>	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
<b>Konjugat-Konzentrat</b>	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
<b>Endvolumen</b>	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

<b>Anzahl Streifen</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>
<b>Verdünnungs/ Waschpuffer</b>	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
<b>Konjugat-Konzentrat</b>	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
<b>Endvolumen</b>	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

<b>Anzahl Streifen</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>
<b>Verdünnungs/ Waschpuffer</b>	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
<b>Konjugat-Konzentrat</b>	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
<b>Endvolumen</b>	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml