

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 FÜR IN VITRO DIAGNOSTIK



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Deutschland

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Webseite: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Inhalt

1. Verwendungszweck	3
2. Diagnostische Bedeutung	3
3. Testprinzip	3
4. Packungsinhalt	3
4.1 Kit für 32 Bestimmungen	3
4.2 Kit für 96 Bestimmungen	4
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	4
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)	5
8. Untersuchungsmaterial	5
9. Testdurchführung	5
9.1 Vorbereitung der Proben	5
9.2 Vorbereitung der Reagenzien	5
9.3 Immunoblot Testdurchführung	6
9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren	7
10. Testauswertung	7
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	8
11. Leistungsdaten	9
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
12. Literatur	11
13. Testablaufschemata	13

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

4.2 Kit für 96 Bestimmungen

- | | | |
|---|-----------|-------------|
| 1. IgG bzw. IgM Nitrozellulose Teststreifen mit aufgespritzten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig | 3x | 32 Streifen |
| 2. IgG bzw. IgM Cut off Kontrolle , Humanserum, vorverdünnt | 2x | 1,0 ml |
| 3. Verdünnungs-/Waschpuffer , pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel | 4x | 50 ml |
| 4. IgG- bzw. IgM- Konjugat (100x konz.)
Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel | 3x | 0,7 ml |
| 5. Substrat (BCIP/NBT), gebrauchsfertig | 3x | 57 ml |
| 6. Auswertungsprotokollblatt zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse | 3x | 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
	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +8°C	4 Wochen
Waschlösung	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 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.
- Getrübte 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: „Testablaufschema“).

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 Waschschrittes 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.

Testablaufschema siehe letzte Seite

9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren

Für die automatisierte Abarbeitung der Blots und LINEs sind folgende Geräte validiert: Apollo und Profiblot. Grundsätzlich sind alle handelsüblichen Blotautomaten geeignet.

10. Testauswertung

Zur sicheren Auswertung ist jeder LINE Streifen mit zwei Kontrollen ausgestattet:

1. **Serumkontrolle** (= serum control):

Nur nach Inkubation mit Patientenserum erscheint unterhalb der Markierungslinie (= markline) die Seruminkubationsbande.

2. **Konjugatkontrolle** (= conjugate control):

Der LINE Streifen ist mit einer Konjugatkontrollbande ausgestattet, die nach Inkubation mit dem entsprechenden Konjugat erscheint.

Die Testdurchführung ist gültig, wenn auf dem entwickelten Nitrozellulose Teststreifen sowohl die Serumkontrolle als auch die interne Konjugatkontrolle deutlich zu erkennen ist.

Die Position der Serum- / und der Konjugatkontrollbande entnehmen Sie dem Protokollblatt.

10.1 Auswertung der Patientenproben

Die Position und Bezeichnung der reaktiven Banden entnehmen Sie bitte dem Protokollblatt.

IgM-Banden: gp125, p18, EA-D

IgG-Banden: EBNA1, gp125, p18, EA-D

10.2 Einsatz der Cut off Kontrolle

Banden deren Intensität schwächer als die Cut off Bande(n) der Cut off Kontrolle sind, werden nicht in die Bewertung einbezogen.

<u>IgG Cut off Banden:</u>	1. p18 zur Beurteilung:	der gp125-, p18- und EA-D-Bande der EBNA1-Bande, bei pos. IgM-Serologie
	2. EBNA1 zur Beurteilung:	der EBNA1-Bande, bei neg. IgM-Serologie
<u>IgM Cut off Bande:</u>	p18 zur Beurteilung:	der gp125-, p18- und EA-D-Bande

10.3 Bedeutung der Antigene

Auflistung der verwendeten synthetischen Antigen-Peptide (EBNA1, p18, EA-D) sowie des affinitätsgereinigten gp125 Antigens des Epstein Barr Virus-Antigens.

Antigen / Bezeichnung	Bedeutung der Antigene	Spezifität der Antikörper im LINE
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-gp125	Es wurden verschiedene "Virus Capsid Antigene" beschrieben. Als immun-dominant 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-gp125: hochspezifischer genereller Marker für EBV-Infektionen IgM: hochspezifisch für eine EBV-Primärinfektion

VCA-p18	Siehe auch die Erläuterungen unter "Bedeutung" 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.	IgG-p18: hochspezifischer Marker für den Kontakt mit EBV im fortgeschrittenen Stadium IgM: hochspezifisch für eine EBV-Primärinfektion
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-Primärinfektionen 2.) serologischer Marker für eine EBV-Reaktivierung IgM: spezifisch für EBV-Primärinfektionen

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
keine Bande oder Bande(n) < Cut-off-Bande	negativ	Keine IgM-Antikörper gegen EBV-Antigene nachweisbar.
gp125 ≥ Cut-off-Bande (p18)	positiv	Hinweis auf eine <u>Primärinfektion</u> , insbesondere bei fehlender IgG-Immunantwort gegen EBNA1 (s. auch IgG-Beurteilung für EBNA1)
p18 ≥ Cut-off-Bande (p18)	positiv	Hinweis auf eine <u>Primärinfektion</u> , insbesondere bei fehlender IgG-Immunantwort gegen EBNA1 (s. auch IgG-Beurteilung für EBNA1)
EA-D isoliert reaktiv ≥ 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	Auf tretende Bande(n) im IgG ≥ Cut off Bande				IgG-Beurteilung	Beispieltext Befund
	EBNA1 ≥ EBNA1 Cut off Bande	gp125 ≥ p18 Cut off Bande	p18 ≥ p18 Cut off Bande	EA-D ≥ 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 \geq 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: Ringversuchserum 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	
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	30 Minuten	15 µl Patientenserum/-plasma / 100 µl Kontrolle in je 1,5 ml Verdünnungs- /Waschpuffer
Waschen	3 x 5 Minuten	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Konjugatinkubation	30 Minuten	Mit 1,5 ml Gebrauchsverdünnung (1 + 100)
Waschen	3 x 5 Minuten 1 x 1 Minute	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer Mit Aqua dest./deionisiert
Substratinkubation	10 ± 3 Minuten	Mit je 1,5 ml Substratlösung
Stoppen	3 x ohne Zwischeninkubation	Mit je 1,5 ml Aqua dest./deionisiert

Konjugatverdünnungstabelle: (gerundet)

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

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

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

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