

VIROTECH EBV IgG LINE Immunoblot

(EBV IgG LINE-32)

Numer zamówienia: WE102G32

(EBV IgG LINE-96)

Numer zamówienia: WE102G96

VIROTECH EBV IgM LINE Immunoblot

(EBV IgM LINE-32)

Numer zamówienia: WE102M32

(EBV IgM LINE-96)

Numer zamówienia: WE102M96

TYLKO DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

VIROTECH Diagnostics GmbH

Löwenplatz 5

D- 65428 Rüsselsheim

Telefon: +49-6142-6909-0

Faks: +49-6142-82621

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Freigabedatum: 25.10.2018

REV 3 / VIROTECH EBV IgG/IgM LINE Immunoblot PL

Spis treści

1. Cel zastosowania.....	3
2. Zasada przeprowadzania badań	3
3. Zawartość opakowania.....	3
3.1 Zestaw dla 32 określeń.....	3
3.2 Zestaw dla 96 określeń.....	3
4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz odczynników	4
5. Środki ostrożności oraz wskazówki ostrzegawcze	4
6. Materiały dodatkowo potrzebne (niezałączone w zestawie)	4
7. Materiał badawczy	5
8. Przeprowadzanie testu /badania/	5
8.1 Przygotowanie próbek.....	5
8.2 Przygotowywanie odczynników	5
8.3 Przeprowadzanie testu Immunoblot	5
8.4 Zastosowanie procesorów Immunoblot	6
9. Ocena wyników badania.....	6
9.1 Ocena próbek pacjentów	7
9.2 Zastosowanie kontroli cut off.....	7
9.3 Znaczenie antygenów	7
9.4 Kryteria oceny.....	8
9.5 Granice testu	9
10. Literatura.....	9
11. Schemat przebiegu testu.....	10

1. Cel zastosowania

Zestaw testowy LINE Immunoblot do jakościowego oznaczania swoistych przeciwciał IgG lub IgM wirusa Epsteina-Barr (EBV) w surowicy ludzkiej. Zestaw można stosować w rozszerzonej diagnostyce EBV do zrównicowania lub zabezpieczenia seronegatywności, zakażenia pierwotnego i przebytego zakażenia.

2. Zasada przeprowadzania badań

Białka antygeny czynnika chorobotwórczego są przenoszone za pomocą specjalnej metody rozpyłowej na membranę nitrocelulozową. Membrana nitrocelulozowa zostaje następnie pociana na pojedyncze paski. Inkubacja opłaszczonych antygenami pasków z nitrocelulozy z próbkami surowicy ludzkiej/osocza ludzkiego pozwala na oznaczenie obecnych swoistych przeciwciał. Te przeciwciała stanowią immunokompleksy ze znajdującymi się na paskach testowych i tam umocnionymi antygenami. Po usunięciu niezwiązanych przeciwciał poprzez poszczególne kroki procedury mycia pojedyncze paski nitrocelulozy zostają inkubowane wraz z antyludzkimi przeciwciałami IgG lub IgM koniugowanymi alkaliczną fosfatazą. Po usunięciu poprzez dalszy krok w procedurze mycia niezwiązanych skoniugowanych przeciwciał następuje uwidocznienie kompleksów antygenów/przeciwciał/przeciwciał związanych/ poprzez dodanie niebarwionego podłoża-substratu, który w wyniku enzymatycznej przemiany wytwarza niebiesko-fioletowe pasma /pasma antygenów. Reakcja enzymatyczno-substratowa zostaje zahamowana poprzez przemycie pasków nitrocelulozowych przy pomocy wody destylowanej /dejonizowanej/. W zależności od zaobserwowanego wzoru pasm można zamknąć /procedurę/ w odniesieniu do obecności swoistych przeciwciał IgG lub IgM.

3. Zawartość opakowania

3.1 Zestaw dla 32 określeń

1. Paski testowe IgG lub IgM z nitrocelulozy spryskane antygenami, wzmocnione folią, sortowane w zeszyku, gotowe do użycia	1x	32 pasków
2. Sprawdzian IgG lub IgM typu Cut off, surowica ludzka, po rozcieńczeniu wstępnym	1x	1,0 ml
3. Bufor do rozcieńczania/płukania , pH 7,3 (10x stęż.), ze środkiem konserwującym i Tris	2x	50 ml
4. Koniugat IgG lub IgM Koniugat (100x skoncentrowany) antyludzki, (kozia)-alkaliczna fosfataza, ze środkiem konserwującym	1x	0,7 ml
5. Substrat (BCIP/NBT), gotowy do użycia	1x	57 ml
6. Karta protokołu czynności oceniania do protokołowania i archiwizowania wyników	1x	1 sztuka.

3.2 Zestaw dla 96 określeń

1. Paski testowe IgG lub IgM z nitrocelulozy spryskane antygenami, wzmocnione folią, sortowane w zeszyku, gotowe do użycia	3x	32 pasków
2. Sprawdzian IgG lub IgM typu Cut off, surowica ludzka, po rozcieńczeniu wstępnym	2x	1,0 ml
3. Bufor do rozcieńczania/płukania , pH 7,3 (10x stęż.), ze środkiem konserwującym i Tris	4x	50 ml
4. Koniugat IgG lub IgM Koniugat (100x skoncentrowany) antyludzki, (kozia)-alkaliczna fosfataza, ze środkiem konserwującym	3x	0,7 ml
5. Substrat (BCIP/NBT), gotowy do użycia	3x	57 ml
6. Karta protokołu czynności oceniania do protokołowania i archiwizowania wyników	3x	1 sztuka.

Na życzenie dostępne również

IgG wzgl. IgM- kontrola dodatnia, ludzka surowica, po rozcieńczeniu wstępnym, 0,5 ml.
Pasma dodatnie ≥ punkt odcięcia można znaleźć w załączonym certyfikacie.
(nr katalog.: IgG: WE102P60 wzgl. IgM: WE102P80)

IgG/IgM- kontrola ujemna, ludzka surowica, po rozcieńczeniu wstępnym, 0,5 ml.
Kontrola ujemna nie wykazuje żadnych pasm wzgl. żadnych istotnych dla interpretacji pasm ≥ punktu odcięcia.
(nr katalog.: IgG/IgM: WE102N10)

4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz odczynników

Zestaw testowy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Okres trwałości poszczególnych komponentów jest zaznaczony na odpowiedniej etykiecie, okres trwałości zestawu patrz certyfikat kontroli jakości.

1. Poszczególnych odczynników nie należy zamrażać i nie wystawiać ich na działanie wysokich temperatur.
2. Nie używać odczynników po upływie ich daty ważności.
3. Należy unikać składowania odczynników w sytuacji /w pomieszczeniach/ jaskrawego światła.
4. Roztwór substratu BCIP/ NBT wrażliwy jest na światło, dlatego przechowywany musi być w pomieszczeniach /naczyniach/ ciemnych.
5. **Paski testowe nitrocelulozowe:** Po wyjściu pasków z torebki należy ich natychmiast użyć. Torebki z nieużywanymi paskami natychmiast znowu szczelnie zamknąć i przechowywać w temperaturze od 2 do 8°C. Dla archiwizowania wyników paski testowe nitrocelulozowe muszą być koniecznie chronione przed bezpośrednim światłem słonecznym celem uniknięcia napłynięcia poszczególnych tasiemek.

Materiał	Stan	Przechowywanie	Stabilność
Próbki	bez rozcieńczenia	+2 do +8°C	1 tydzień
Paski testowe	po otwarciu	+2 do +8°C (przechowywanie w dostarczonej torebce)	3 miesiące
Kontrole	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Koniugat	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	ok. 6 h
Substrat	po otwarciu	+2 do +8°C (chronić przed światłem)	3 miesiące
Roztwór do pójmania	po otwarciu	+2 do +8°C (chronić przed światłem)	3 miesiące
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	+2 do +8°C	4 tygodnie
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	lub temperatura pokojowa	2 tygodnie

5. Środki ostrożności oraz wskazówki ostrzegawcze

1. Jako surowice kontrolne stosowane są tylko takie surowice, która zostały przebadane i uzyskały wynik negatywny na przeciwciała przeciw HIV1, HIV2, HCV i antygen powierzchniowy wirusa Hepatitis B. Surowice kontrolne, próbki, próbki rozcieńczone, koniugaty i nitrocelulozowe paski testowe należy mimo to traktować jako materiał potencjalnie zakaźny i obchodzić się z nimi odpowiednio ostrożnie. Obowiązują odpowiednie wytyczne dotyczące prac laboratoryjnych.
2. W trakcie przeprowadzania procedury Immunoblot należy nosić rękawice jednorazowego stosowania i używać pincety plastikowej.
3. Usuwanie zużytych materiałów następuje zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym kraju.
4. Tace do inkubacji są przeznaczone przez producenta tylko do jednorazowego użycia. Wielokrotne użycie tac do inkubacji następuje na odpowiedzialność użytkownika. W przypadku ewentualnego wielokrotnego zastosowania zalecamy dezynfekcję tac do inkubacji po użyciu przez kilka godzin w 1% roztworze podchlorynu sodu, ich czyszczenie oraz dokładne płukanie wodą wodociągową i wodą destylowaną/ dejonizowaną.

6. Materiały dodatkowo potrzebne (niezawłączone w zestawie)

1. Wanna inkubacyjna /w razie konieczności można ją otrzymać pod numerem zamówienia WE300.08/
2. Wstrząsacz /pionowy, nie centryfugalny/
3. Butelka do wstrzyknięcia dla wykonywania pomiarów
4. Pipeta lub urządzenie do mycia ręcznego
5. Mikropipeta 5 µl - 1500 µl
6. Nasadki do pipet
7. Rurki próbnicze /tubki do próbek/ - o pojemności od 2 do 20 ml
8. Pinceta plastikowa

9. Woda destylowana lub dejonizowana
10. Papier filtracyjny /filtrowy/

7. Materiał badawczy

Jako materiał badawczy można zastosować surowicę i osocze (przy tym nie ma znaczenia rodzaj antykoagulantów), nawet jeśli w ulotce informacyjnej wymieniona jest tylko surowica.

8. Przeprowadzanie testu /badania/

Dokładne przestrzeganie przepisów roboczych VIROTECH Diagnostics jest warunkiem uzyskania prawidłowych wyników.

8.1 Przygotowanie próbek

1. Na próbkę pacjenta wymagane jest 15 µl surowicy lub osocza.
2. próbki krwi należy pobierać w warunkach aseptycznych poprzez punkcję żyły. Po całkowitej koagulacji należy oddzielić surowicę (nie dotyczy osocza). Chłodzić przechowywać próbki krwi surowicę należy zamrażać w temperaturze -20°C.
3. Unikać należy powtórnego zamrażania i rozmrażania surowic.
4. Surowice, które zostały zaktywizowane w temperaturze dodatniej, lipemicznie, hemolitycznie lub kontaminowane mikrobiologicznie prowadziły do sfałszowanych wyników, dlatego te nie powinny być używane i wykorzystywane.
5. Nie używać i nie wykorzystywać zmrożonych próbek surowicy /w szczególności po ich rozmrożeniu/, w razie konieczności centrifugować /5 minut w sytuacji 1000 x g/, wyklarować /oczyć/, odpipetować warstwę górną, po czym wykorzystać w teście badawczym.

8.2 Przygotowywanie odczynników

1. W celu dostosowania do procedur laboratoryjnych możliwe jest przetwarzanie wszystkich testów LINE i EcoBlot w jednym przebiegu testu z takimi samymi czasami inkubacji i składnikami niezależnymi od parametrów/serii. Kontrole cut off są stosowane w sposób swoisty dla parametrów i serii.
2. Przed rozcieńczeniem wszystkich odczynników testowych aktualny/dany koncentrat doprowadzić należy do temperatury pokojowej. Używać jedynie wody destylowanej /dejonizowanej/ wysokiej jakości, a badania i testy przeprowadzać w temperaturze pokojowej.
3. Roztwory rozcieńczone należy przed zastosowaniem ich do testów dobrze przemieszać.
4. **Środek myjny buforowy rozcieńczający**
Bufor do rozcieńczania/płukania jest dostępny w 10-krotnym stężeniu. Koncentrat buforu do rozcieńczania/płukania rozcieńczyć w stosunku 1:10 wodą destylowaną lub dejonizowaną (10ml/50ml/100ml koncentratu + 90ml/450ml/900ml wody dest./dejonizowanej), dobrze wymieszać.
Zarówno stężony, jak i rozcieńczony bufor do rozcieńczania/płukania może mieć ewentualnie duże zabarwienie. Takie duże zabarwienie nie ma wpływu na okres trwałości buforu do rozcieńczania/płukania, ani na funkcjonalność i znaczenie diagnostyczne testu.
5. **Koniugat IgG lub IgM**
Koniugat rozcieńczyć 1 + 100 ostatecznie rozcieńczonym buforem do rozcieńczania/płukania. Dobrze wymieszać. Na jedną próbkę surowicy wymagane jest 1,5 ml roztworu użytkowego koniugatu. Patrz tabela rozcieńczania koniugatu (punkt: "Schemat przebiegu badania").
6. **Roztwór substratu**
Roztwór substratu dostarczany jest w stanie gotowym do użytku.

8.3 Przeprowadzanie testu Immunoblot

Uwaga: Nitrocelulozowe paski testowe testowane być mogą jedynie w dozwolonej klasie Ig /zobacz - etykieta na zeszyciku Blot oraz określenie na każdym poszczególnym pasku testowym/..

Do prawidłowego wykonania i oceny testu EBV LINE w każdej próbie musi występować swoista dla parametrów i serii kontrola cut off.

Dla pewnego zdiagnozowania EBV LINE, należy ją przeprowadzić w opcji IgG oraz IgM.

1. Test przeprowadzał naleŹy w temperaturze pokojowej.
2. W odniesieniu do kaŹdej próbki wŹyŹ kaŹdorazowo 1 pasek do rynny czystej wanny inkubacyjnej. Paski dotykaŹ naleŹy moŹliwie jedynie na oznakowanym górnym ich koŹcu.
3. PipetowaŹ kaŹdorazowo 1,5ml gotowego do uŹytku **środek myjny buforowy rozcieŹczajŹcy**, po czym ustawiŹ na wstrzŹsaczu. ZwracaŹ przy tym uwagŹ na to, by paski testowe nitrocelulozowe równomiernie przykryte byŹ pŹynem, paski testowe bowiem nie mogŹnulegaŹ procesowi wysychania w trakcie caŹego okresu przeprowadzania testu.
4. Przykryte pŹynem /dosŹ schowane/ paski testowe nitrocelulozowe caŹe sŹnawilŹane w czasie jednej minuty, i inkubowane byŹ mogŹnazarŹwno w poŹpŹeniu grzbietowym, brzuszny lub boczny.
5. DodaŹ pipetŹno po **15 μ l surowicy/osocza pacjenta** lub **100 μ l** kontroli cut off/pozytywnej/negatywnej, w miarŹ moŹliwoŹci przy górnym, oznaczonym koŹcu paska. SurowicŹpacjenta oraz kontrolŹinkubowaŹ na wstrzŹsaczu przez okres 30 minut. W trakcie pipetowania i gŹŹznego odlewania zwracaŹ uwagŹ na to, by nie doszŹo do kontaminacji krzyŹowej/skrzyŹwanej poszczegŹlnych próbek pacjentŹw.
6. WyssaŹ pŹyn caŹkowicie z rynien lub ostroŹnie odlaŹ ten pŹyn. W przypadku odlewania pŹynu paski testowe nitrocelulozowe pozostajŹna spodzie rynien i przylegajŹ do nich. PozostaŹe resztki pŹynu odkropliŹ na papier chŹpny /bibuŹŹ.
7. **Mycie** paskŹw: inkubowaŹ paski kaŹdorazowo na wstrzŹsaczu uŹywajŹc 1,5 ml gotowego do uŹytku **środka myjnego buforowego rozcieŹczajŹcego** w czasie 3 x 5 minut. Za kaŹdym razem bufor myjny caŹkowicie odessaŹ lub odlaŹ. Przed zakoŹczeniem ostatniego kroku myjnego sporzŹdziŹ potrzebŹn iloŹŹ roztworu w oparciu o ŹwieŹy roztwŹr koniugatu /zobacz - tabela/.
8. WyssaŹ pŹyn caŹkowicie z rynien lub odlaŹ /zobacz - punkt 6/.
9. PipetowaŹ kaŹdorazowo 1,5 ml sporzŹdzonego **roztworu koniugatu** do odpowiednich rynien inkubacyjnych, po czym inkubowaŹ go na wstrzŹsaczu **30 minut**.
10. WyssaŹ pŹyn caŹkowicie z rynien lub odlaŹ.
11. **Mycie** paskŹw: inkubowaŹ paski kaŹdorazowo na wstrzŹsaczu uŹywajŹc 1,5 ml gotowego do uŹytku **środka myjnego buforowego rozcieŹczajŹcego** w czasie 3 x 5 minut. Za kaŹdym razem bufor myjny caŹkowicie odessaŹ lub odlaŹ. NastŹpnie spŹykaŹ **wodŹn destylowanŹ lub wodŹn dejonizowanŹ w czasie 1 x 1 minuta**.
12. WyssaŹ pŹyn caŹkowicie z rynien lub odlaŹ (zobacz - punkt 6).
13. PipetowaŹ kaŹdorazowo 1,5 ml gotowego do uŹytku **roztworu substratu** do rynien, po czym rozwijaŹ go w czasie **10 $\pm$ 3 minuty** na wstrzŹsaczu.
14. **ZatrzymaŹ** proces nabierania barwy poprzez odlanie roztworu substratu. NastŹpnie myŹ paski bez inkubacji poŹredniej **3 x** przy pomocy kaŹdorazowo 1,5 ml **wody destylowanej lub wody dejonizowanej**.
15. Odlaj wodŹn destylowanŹ /wodŹn dejonizowanŹ, po czym suszyŹ paski na czystym zdolnym do wysysania pŹynu papierze /bibule/. Zabarwienie tŹa /podŹŹba/, ktŹre moŹna zaobserwowaŹ w odniesieniu do wilgotnych paskŹw testowych nitrocelulozowych, znika zupeŹnie w przypadku paskŹw suszonych. Wzmocnione paski testowe nitrocelulozowe wymagajŹ w porŹwnaniu do konwencjonalnych paskŹw testowych nitrocelulozowych nieco wiŹcej czasu do zupeŹnego ich wyschniŹcia.
16. Celem sporzŹdzenia oceny wykorzystaŹ doŹŹczony protokŹł oceny. Opisy i napisy szczegŹłowe na karcie protokŹłowej uŹŹtwiŹ PaŹŹstwu ocenŹj próbek pacjentŹw.

Schemat przebiegu testu - zobacz strona ostatnia

8.4 Zastosowanie procesorŹw Immunoblot

Do zautomatyzowanego przetwarzania testŹw Blot i LINE walidowane sŹ nastŹpujŹce urzŹdzenia: Apollo i Profiblot. Zasadniczo nadajŹ siŹ wszystkie dostŹpne w handlu automaty Blot.

9. Ocena wynikŹw badania

Dla dokonania bezpiecznej i pewnej oceny kaŹdy z paskŹw LINE wyposaŹbny jest w dwie kontrole:

1. **Kontrola surowicy** (= serum control): Jedynie po inkubacji z obecnoŹciŹ surowicy pacjentŹw ukazuje siŹ pod liniŹ oznakowanŹ/= markline/ pasmo inkubacyjne surowicy.
2. **Kontrola koniugatu** (= conjugate control): Pasek LINE jest wyposaŹbny w pasmo kontrolne koniugatu, ktŹre pojawia siŹ po inkubacji z odpowiednim koniugatem.

Przeprowadzenie testu jest udane /dosć aktualne/, gdy na rozwiniętym pasku testowym nitrocelulozowym można rozpoznać w sposób wyraźny zarówno kontrolę surowicy, jak również i wewnętrzny kontrolny kontrolny koniugatu. Pozycję paska kontrolnego surowicy oraz paska kontrolnego koniugatu znajdziecie Państwo w karcie protokołu.

9.1 Ocena próbek pacjentów

Pozycję i nazwę pasm reakcyjnych można znaleźć w formularzu protokołu.

Pasma IgM: gp125, p18, EA-D

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

9.2 Zastosowanie kontroli cut off

Pasma, których intensywność jest mniejsza niż pasm(a) cut off kontroli cut off, nie są wykorzystywane do oceny.

Pasma IgG Cut off: 1. **p18** do oceny:

pasma gp125, p18 i EA-D

pasma EBNA1, przy pozytywnej serologii IgM

2. **EBNA1** do oceny:

pasma EBNA1, przy neg. serologii IgM

Pasma IgM cut off:

gp18 do oceny:

pasma gp125, p18 i EA-D

9.3 Znaczenie antygenów

Wykaz stosowanych syntetycznych peptydów antygenowych (EBNA1, p18, EA-D) oraz oczyszczonego metodą powinowactwa antygeny gp125 antygeny wirusa Epsteina Barr.

Antygen / Nazwa	Znaczenie antygenów	Swoistość przeciwciałw LINE
EBNA1	Epstein-Barr Nuclear Antigen, białko wirusowe, którego ekspresja ma miejsce w jądrze komórek z utajonym zakażeniem. Przeciwciała IgG przeciwko EBNA1 są uznawane za pewne markery przebytego zakażenia EBV. W rzadkich wyjątkowych przypadkach może nie występować odpowiedź immunologiczna IgG na EBNA1 (<i>pierwotnie lub wtórnie</i>). U pacjentów o obniżonej reakcji immunologicznej miana przeciwciał IgG przeciw EBNA1 mogą silnie spadać (wtórna utrata EBNA1).	IgG: Centralny wysoce swoisty Marker <u>przebytego</u> zakażenia EBV
VCA-gp125	Opisano różne antygeny Wirus Capsid Antigen. Jako immunodominujące uznawane są białka gp125 i p18. Przeciwciała IgM przeciwko VCA-gp125/p18 znikają z reguły ponownie kilka tygodni po zakażeniu, przeciwciała IgG przeciwko VCA-gp125/p18 utrzymują się przez całe życie. W przypadku reaktywacji czasami dochodzi do ponownego wytworzenia przeciwciał IgM przeciwko VCA-gp125/p18.	IgG-gp125: wysoce swoisty ogólny marker zakażenia EBV IgM: wysoce swoisty marker <u>pierwotnego zakażenia</u> EBV
VCA-p18	Patrz również objaśnienia w punkcie "Znaczenie" przy VCA-gp125. Peptyd p18 jest w serologii IgM wysoce swoistym markerem zakażenia pierwotnych. W przypadku zakażenia pierwotnych z reguły najpierw ma miejsce wyraźna odpowiedź przeciwciał IgM anty-p18, a następnie wzrost przeciwciał IgG anty-p18. Ten wzrost IgG osiąga swoje maksimum, gdy miana IgM spadają, a przed wystąpieniem odpowiedzi immunologicznej IgG na EBNA1.	IgG-p18: wysoce swoisty marker kontaktu z EBV w stadium zaawansowanym IgM: wysoce swoisty marker <u>pierwotnego zakażenia</u> EBV
EA-D	E arly Antigen-Diffuse należą do wczesnych antygenów, których synteza odbywa się w cyklu replikacji wirusowej (aktywnej fazie zakażenia). Przeciwciała IgG i IgM przeciwko EA-D występują zwykle w przypadku zakażenia pierwotnych przy jednocześnie negatywnym EBNA-IgG. Podczas rekonwalescencji przeciwciała IgG przeciwko EA-D spadają, ale może dojść również do ich ponownego silnego wzrostu w przypadku reaktywacji EBV.	IgG: 1.) swoiste dla <u>zakażenia pierwotnych</u> EBV 2.) marker serologiczny reaktywacji EBV

	Ten wzrost przeciwciał nie daje jednak informacji o istotności klinicznej reaktywacji EBV.	IgM: swoiste dla <u>zakażeń pierwotnych</u> EBV
--	--	---

9.4 Kryteria oceny

Interpretacja wyników serologicznych powinna zawsze uwzględniać obraz kliniczny, dane epidemiologiczne oraz dalsze badania do dyspozycji wyniki laboratoryjne.

Zalecana ocena IgM

Pasmo(-a)	Ocena	Opinia
brak pasm <u>lub</u> pasm(-a) < pasma Cut off	negatywna	Niewykrywalne przeciwciała IgM przeciwko antygenom EBV.
gp125 ≥ pasma Cut off (p18)	pozytywna	Wskazówka <u>zakażenia pierwotnego</u> , zwłaszcza w przypadku braku odpowiedzi immunologicznej IgG na EBNA1 (patrz również ocena IgG dla EBNA1)
p18 ≥ pasma Cut off (p18)	pozytywna	Wskazówka <u>zakażenia pierwotnego</u> , zwłaszcza w przypadku braku odpowiedzi immunologicznej IgG na EBNA1 (patrz również ocena IgG dla EBNA1)
EA-D izoluje reaktywnie ≥ pasma Cut off (p18)	negatywna	Przeciwciała IgM przeciwko EA-D są wytwarzane <u>często w zakażeniach pierwotnych</u> , występują jednak zawsze razem z przeciwciałami IgM przeciwko p18 i/lub gp125 i z tego powodu nie są uwzględniane w ocenie.

Zalecana ocena IgG przy negatywnej ocenie IgM

	Występujące pasmo(-a) w IgG				Ocena IgG	Przykładowy tekst wyniku
Ocena IgM	EBNA1 pasm cut off EBNA1	gp125 pasm cut off p18	p18 pasm cut off p18	EA-D pasm cut off p18		
Negatywna	neg.	neg.	neg.	neg.	Negatywna	Nie wykryto przeciwciał przeciw antygenowi EBV
	poz.	neg./poz.	neg./poz.	neg./poz.	Pozytywna	Wskazuje na przebyte zakażenie EBV
	neg.	poz.	poz.	neg./poz.	Pozytywna	Wskazuje na przebyte zakażenie EBV
	neg.	poz.	neg.	neg.	Pozytywna	Wskazuje na kontakt z EBV. Nie jest możliwe rozróżnienie między pierwotnym a przebyłym zakażeniem. Zalecana kontrola
	neg.	neg.	poz.	neg.	Pozytywna	Wskazuje na przebyte zakażenie EBV. Zalecana kontrola
	neg.	neg.	neg.	poz.	Pozytywna	Wskazuje na kontakt z EBV. Pilnie zalecana kontrola.
	neg.	poz.	neg.	poz.	Pozytywna	Podejrzanie zakażenia pierwotnego EBV. Pilnie zalecana kontrola
	neg.	neg.	poz.	poz.	Pozytywna	Wskazuje na kontakt z EBV. Nie jest możliwe rozróżnienie między pierwotnym a przebyłym zakażeniem. Zalecana kontrola

Zalecana ocena IgG przy pozytywnej ocenie IgM

	Występujące pasmo(-a) w IgG				Ocena IgG	Przykładowy tekst wyniku
Ocena IgM	EBNA1	gp125	p18	EA-D		
Pozytywna	neg.	neg.	neg.	neg.	Negatywna	Wskazuje na zakażenie pierwotne
	poz.	neg./poz.	neg./poz.	neg./poz.	Pozytywna	Wskazuje na przebyte zakażenie EBV
	neg.	poz.	neg./poz.	neg./poz.	Pozytywna	Wskazuje na zakażenie pierwotne
	neg.	neg./poz.	poz.	neg./poz.	Pozytywna	Wskazuje na zakażenie pierwotne
	neg.	neg./poz.	neg./poz.	poz.	Pozytywna	Wskazuje na zakażenie pierwotne

9.5 Granice testu

1. Negatywny wynik testu blot nie wyklucza całkowicie możliwości zakażenia EBV.
2. W rzadkich przypadkach surowice pacjentów mogą pokazywać "odwrócone" pasma (ciemne tło, białe pasma); nie podlegają one ocenie, tzn. test Immunoblot nie może być w takich przypadkach oceniany. Surowicę należy sprawdzić innymi metodami serologicznymi.
3. Sama serologia EBV daje pewnych informacji o istotności klinicznej reaktywacji (9).
4. Negatywny wynik anty-EBNA1 nie jest koniecznym wskazaniem zakażenia pierwotnego. W przypadku pacjentów o obniżonej reakcji immunologicznej może dojść do wtórnej utraty anty-EBNA1 i u 5% zakażonych EBV (EBNA1-nonresponder) nie jest wytwarzany anty-EBNA1 (7).
5. Negatywny wynik VCA-IgM nie wyklucza możliwości wystąpienia zakażenia pierwotnego, ponieważ w niektórych przypadkach ostrego zakażenia nie jest wytwarzane VCA-IgM (IgM-nonresponder) (7).
6. Przeciwciała przeniesione pasywnie na krótko przed badaniem mogą mieć wpływ na test serologiczny EBV. Dotyczy to np. transfuzji krwi lub w przypadku przeciwciałmatki przeniesionych na niemowlę.

10. Literatura

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

11. Schemat przebiegu testu

Przeprowadzanie testu w formie skróconej:

Inkubacja próbek	30 minut	15 µl surowicy/osocza pacjenta / 100 µl kontrola w kaŹdorazowo 1,5 ml Œrodka myjnego buforowego rozcieŹczajŹcego
Mycie	3 x 5 minut	Z obecnoŒciŹ kaŹdorazowo 1,5 ml Œrodka myjnego buforowego rozcieŹczajŹcego
Inkubacja koniugatu	30 minut	Z obecnoŒciŹ 1,5 ml roztworu uŹytkowego (1 + 100)
Mycie	3 x 5 minut	Z obecnoŒciŹ kaŹdorazowo 1,5 ml Œrodka myjnego buforowego rozcieŹczajŹcego
	1 x 1 minuta	Z obecnoŒciŹ wody destylowanej lub dejonizowanej
Inkubacja substratu	10 ± 3 minut	Z obecnoŒciŹ kaŹdorazowo 1,5 ml roztworu substratu
Zatrzymywanie	3 x bez fazy poŒredniej inkubowania	Z obecnoŒciŹ kaŹdorazowo Mit je 1,5 ml wody destylowanej lub wody dejonizowanej

Tabela rozcieŹczania koniugatu: /wartoŒci zaokrŹglone/ Ko:

Liczba pasków	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Œrodek myjny buforowy rozcieŹczajŹcy	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Koncentrat koniugatu	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
PojemnoŒŹ koŹcowa	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Liczba pasków	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Œrodek myjny buforowy rozcieŹczajŹcy	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Koncentrat koniugatu	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
PojemnoŒŹ koŹcowa	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Liczba pasków	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Œrodek myjny buforowy rozcieŹczajŹcy	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Koncentrat koniugatu	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
PojemnoŒŹ koŹcowa	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Liczba pasków	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Œrodek myjny buforowy rozcieŹczajŹcy	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Koncentrat koniugatu	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
PojemnoŒŹ koŹcowa	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml