

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



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Niemcy

Tel.: +49 6074 23698-0

Faks: +49 6074 23698-900

Adres e-mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Strona internetowa: clinical.goldstandarddiagnostics.com



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 różnicowania 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 pocięta 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 nie barwionego podłoża-substratu, który w wyniku enzymatycznej przemiany wytwarza niebiesko-fioletowe pasma /"pasma antygeny"/. 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 zeszytiku, 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 protokolowania 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 zeszytiku, 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 protokolowania 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 $\geq$ 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 $\geq$ 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 wyjęciu 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 napęczenia 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 (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Roztwór do płukania	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc 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 użytku. 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 (niezałączone w zestawie)

1. Wanna inkubacyjna /w razie konieczności można ją otrzymać pod numerem zamówienia WE300.08/
2. Wstrząsacz /pionowy, nie centryfugalny/
3. Butelka do wstrzyknięć 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

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 instrukcji roboczych jest warunkiem uzyskania prawidłowych wyników.

8.1 Przygotowanie próbek

1. Na próbkę pacjenta wymagane jest 15 µl surowicy lub osocza.
2. Próbkę krwi należy pobierać w warunkach aseptycznych poprzez punkcję żyły. Po całkowitej koagulacji należy oddzielić surowicę (nie dotyczy osocza). Chcąc przechowywać próbki dłużej 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 prowadzić mogą do sfalszowanych wyników, dlatego też nie powinny być używane i wykorzystywane.
5. Nie używać i nie wykorzystywać zmętniałych próbek surowicy /w szczególności po ich rozmrożeniu/, w razie konieczności centrifugować /5 minut w sytuacji 1000 x g/, wyklarować /oczyścić/, 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 żółte zabarwienie. Takie żółte 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 próbce musi występować swoista dla parametrów i serii kontrola cut off.

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

1. Test przeprowadzać należy w temperaturze pokojowej.

2. W odniesieniu do każdej próbki włożyć każdorazowo 1 pasek do rynny czystej wanny inkubacyjnej. Paski dotykać należy możliwie jedynie na oznakowanym górnym ich końcu.
3. Pipetować każdorazowo 1,5ml gotowego do użytku **Środek myjny buforowy rozcieńczający**, po czym ustawić na wstrząsaczu. Zwracać przy tym uwagę na to, by paski testowe nitrocelulozowe równomiernie przykryte były płynem, paski testowe bowiem nie mogą ulegać procesowi wysychania w trakcie całego okresu przeprowadzania testu.
4. Przykryte płynem /dosł. schowane/ paski testowe nitrocelulozowe całe są nawilżane w czasie jednej minuty, i inkubowane być mogą zarówno w położeniu grzbietowym, brzuszным lub bocznym.
5. Dodać pipetą po **15 µl surowicy/osocza pacjenta** lub **100 µl** kontroli cut off/pozytywnej/negatywnej, w miarę możliwości przy górnym, oznaczonym końcu paska. Surowicę pacjenta oraz kontrolę inkubować na wstrząsaczu przez okres 30 minut. W trakcie pipetowania i łącznego odlewania zwracać uwagę na to, by nie doszło do kontaminacji krzyżowej/skrzyżowanej poszczególnych próbek pacjentów.
6. Wyssać płyn całkowicie z rynien lub ostrożnie odlać ten płyn. W przypadku odlewania płynu paski testowe nitrocelulozowe pozostają na spodzie rynien i przylegają do nich. Pozostałe resztki płynu odkroplić na papier chłonny /bibułę/.
7. **Mycie** pasków: inkubować paski każdorazowo na wstrząsaczu używając 1,5 ml gotowego do użytku środka myjnego buforowego rozcieńczającego w czasie 3 x 5 minut. Za każdym razem bufor myjny całkowicie odessać lub odlać. Przed zakończeniem ostatniego kroku myjnego sporządzić potrzebną ilość roztworu w oparciu o świeży roztwór koniugatu /zobacz - tabela/.
8. Wyssać płyn całkowicie z rynien lub odlać /zobacz - punkt 6/.
9. Pipetować każdorazowo 1,5 ml sporządzonego **roztworu koniugatu** do odpowiednich rynien inkubacyjnych, po czym inkubować go na wstrząsaczu **30 minut**.
10. Wyssać płyn całkowicie z rynien lub odlać.
11. **Mycie** pasków: inkubować paski każdorazowo na wstrząsaczu używając 1,5 ml gotowego do użytku środka myjnego buforowego rozcieńczającego w czasie 3 x 5 minut. Za każdym razem bufor myjny całkowicie odessać lub odlać. Następnie spłukać **wodą destylowaną lub wodą dejonizowaną w czasie 1 x 1 minuta**.
12. Wyssać płyn całkowicie z rynien lub odlać (zobacz - punkt 6).
13. Pipetować każdorazowo 1,5 ml gotowego do użytku **roztworu substratu** do rynien, po czym rozwijać go w czasie **10 ± 3 minuty** na wstrząsaczu.
14. **Zatrzymać** proces nabierania barwy poprzez odlanie roztworu substratu. Następnie myć paski bez inkubacji pośredniej **3 x** przy pomocy każdorazowo 1,5 ml **wody destylowanej lub wody dejonizowanej**.
15. Odląć wodę destylowaną /wodę dejonizowaną/, po czym suszyć paski na czystym zdolnym do wysysania płynu papierze /bibule/. Zabarwienie tła /podłoża/, które można zaobserwować w odniesieniu do wilgotnych pasków testowych nitrocelulozowych, znika zupełnie w przypadku pasków suszonych. Wzmocnione paski testowe nitrocelulozowe wymagają w porównaniu do konwencjonalnych pasków testowych nitrocelulozowych nieco więcej czasu do zupełnego ich wyschnięcia.
16. Celem sporządzenia oceny wykorzystać dołączony protokół oceny. Opisy i napisy szczegółowe na karcie protokołowej ułatwią Państwu ocenę próbek pacjentów.

Schemat przebiegu testu - zobacz strona ostatnia

8.4 Zastosowanie procesorów Immunoblot

Do zautomatyzowanego przetwarzania testów Blot i LINE walidowane są następujące urządzenia: Apollo i Profiblot. Zasadniczo nadają się wszystkie dostępne w handlu automaty Blot.

9. Ocena wyników badania

Dla dokonania bezpiecznej i pewnej oceny każdy z pasków LINE wyposażony jest w dwie kontrole:

1. **Kontrola surowicy** (= serum control): Jedynie po inkubacji z obecnością surowicy pacjentów ukazuje się pod linią oznakowaną /= markline/ pasmo inkubacyjne surowicy.
2. **Kontrola koniugatu** (= conjugate control): Pasek LINE jest wyposażony w pasmo kontrolne koniugatu, które pojawia się po inkubacji z odpowiednim koniugatem.

Przeprowadzenie testu jest udane /dosł. aktualne/, gdy na rozwiniętym pasku testowym nitrocelulozowym można rozpoznać w sposób wyraźny zarówno kontrolę surowicy, jak również i wewnętrzną kontrolę 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 włączane do oceny.

<u>Pasma IgG Cut off:</u>	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
<u>Pasma IgM cut off:</u>	p18 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 przeciwciał w LINE
EBNA1	Epstein-Barr Nuclear Antigen, białko wirusowe, którego ekspresja ma miejsce w jądrze komórek z utajonym zakażeniem. Przeciwciała IgG przeciwka 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 "Virus Capsid Antigen". Jako immunodominujące uznawane są tu 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 zakażeń 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 zakażeń pierwotnych. W przypadku zakażeń 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	"Early Antigen-Diffuse" należy 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 zakażeń 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. Ten wzrost przeciwciał nie daje jednak informacji o istotności klinicznej reaktywacji EBV.	IgG: 1.) swoiste dla <u>zakażeń pierwotnych</u> EBV 2.) marker serologiczny 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 będące do dyspozycji wyniki laboratoryjne.

Zalecana ocena IgM

Pasmo(-a)	Ocena	Opinia
brak pasm lub pasmo(-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 ≥ pasm cut off				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 przeciwciała 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 ≥ pasm cut off				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 nie 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 występowania 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 przeciwciał matki 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 każdorazowo 1,5 ml środka myjnego buforowego rozcieńczającego
Mycie	3 x 5 minut	Z obecnością każdorazowo 1,5 ml środka myjnego buforowego rozcieńczającego
Inkubacja koniugatu	30 minut	Z obecnością 1,5 ml roztworu użytkowego (1 + 100)
Mycie	3 x 5 minut 1 x 1 minuta	Z obecnością każdorazowo 1,5 ml środka myjnego buforowego rozcieńczającego Z obecnością wody destylowanej lub dejonizowanej
Inkubacja substratu	10 ± 3 minut	Z obecnością każdorazowo 1,5 ml roztworu substratu
Zatrzymywanie	3 x bez fazy pośredniej inkubowania	Z obecnością każdorazowo Mit je 1,5 ml wody destylowanej lub wody dejonizowanej

Tabela rozcieńczania koniugatu: /wartości zaokrąglone/ Ko:

Liczba pasków	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Środek myjny buforowy rozcieńczający	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
Pojemność końcowa	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
Środek myjny buforowy rozcieńczający	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
Pojemność końcowa	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
Środek myjny buforowy rozcieńczający	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
Pojemność końcowa	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
Środek myjny buforowy rozcieńczający	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
Pojemność końcowa	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml