

**EBV EBNA-1-IgG-ELISA PKS medac**

---

Enzymimmunoassay mit **Pipettier-Kontroll-System** (PKS) zur  
quantitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern  
gegen das Epstein-Barr-Virus-spezifische Kernantigen-1  
(EBNA-1) in Serum

Deutsch/English/Français



**HERSTELLER/MANUFACTURER/FABRICANT**

medac  
Gesellschaft für klinische  
Spezialpräparate mbH  
Fehlandtstraße 3  
D-20354 Hamburg

**VERTRIEB/MARKETING/DISTRIBUTION**

medac  
Gesellschaft für klinische  
Spezialpräparate mbH  
Geschäftseinheit Diagnostika  
Theaterstraße 6  
D-22880 Wedel

Tel./Phone: ++49 / 4103 / 80 06-351  
Fax: ++49 / 4103 / 80 06-359

**BESTELLADRESSE/ORDERING ADDRESS/  
ADRESSE DE COMMANDE**

Tel./Phone: ++49 / 4103 / 80 06-111  
Fax: ++49 / 4103 / 80 06-113

Deutsch: S. 1  
English: p. 12  
Français: p. 22

Literatur/References/Littérature: S./p./p. 33

## **EBV EBNA-1-IgG-ELISA PKS medac**

Enzymimmunoassay mit **Pipettier-Kontroll-System** (PKS) zur quantitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen das Epstein-Barr-Virus-spezifische Kernantigen-1 (EBNA-1) in Serum

Katalog-Nr.: 126-PKS

ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

### **EINFÜHRUNG**

Das *Epstein-Barr-Virus* (EBV) gehört zur Familie der *Herpesviridae*. Es besteht aus einem doppelsträngigen DNA-Genom, einem Kapsid, dem Tegument sowie der Virushülle. Typisch für EBV ist, dass sie nach einer Primärinfektion lebenslang latent im Organismus verbleiben.

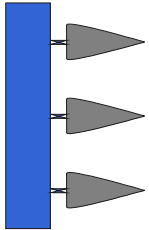
Weltweit sind 90 - 95 % aller erwachsenen Personen mit EBV infiziert. Bei immunkompetenten Personen verlaufen EBV-Primärinfektionen meist asymptomatisch im frühen Kindesalter. Bereits bei geringfügiger Immunsuppression kann es zu einer klinisch meist stummen Reaktivierung des Virus kommen. Bei jungen Erwachsenen manifestiert sich eine EBV-Infektion klinisch als infektiöse Mononukleose (Pfeiffer'sches Drüsenfieber). Unter massiver Immunsuppression können sich EBV-assoziierte, polyklonale B-Zell-Lymphome entwickeln. Bei 60 % aller Hodgkin-Lymphome findet man EBV-DNA. Endemisch relevante, mit EBV in Verbindung stehende Tumorerkrankungen sind das Burkitt-Lymphom und das Nasopharynx-Karzinom.

Für die Antikörperdiagnostik wichtige Antigenkomplexe sind das EBV-spezifische Kernantigen (EBNA), das Virus-Kapsid-Antigen (VCA) und das Early Antigen (EA).

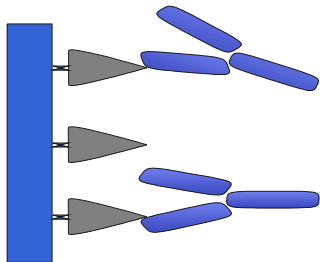
In der EBV-Diagnostik bei Immungesunden steht die Antikörperdiagnostik zur Differenzierung von Primärinfektion gegenüber zurückliegenden Infektionen und Seronegativität im Vordergrund. Die EBV-Serologie kann als ergänzende Diagnostik bei Lymphadenopathien und unklaren neurologischen Erkrankungen von Bedeutung sein. Im Rahmen einer sinnvollen serologischen EBV-Stufendiagnostik, steht die EBNA-1-IgG-Bestimmung an erster Stelle. Ein positives Ergebnis bestätigt eine zurückliegende Infektion. Bei negativem EBNA-1-IgG muß eine Differenzierung über die Bestimmung von VCA-IgG und -IgM erfolgen.

Der EBV EBNA-1-IgG-ELISA PKS medac detektiert IgG-Antikörper, die spezifisch gegen EBNA-1 gerichtet sind. Der Test ist schnell und einfach durchzuführen. Über eine Kalibrationskurve ist die Antikörperkonzentration quantifizierbar und ermöglicht somit zuverlässige Aussagen im Rahmen von Verlaufskontrollen.

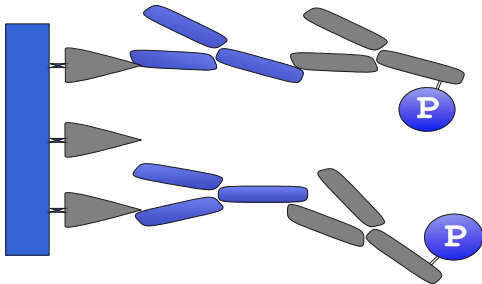
## TESTPRINZIP



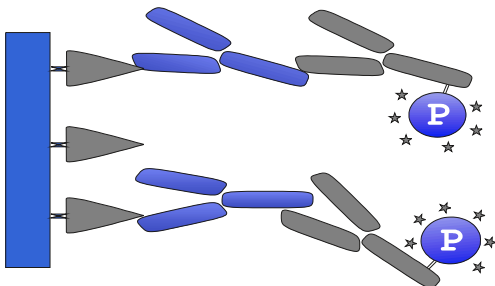
Mit EBV EBNA-1-Antigen beschichtete Mikrotiterplatte.



EBNA-1-spezifische Antikörper aus der Patientenprobe binden an das Antigen.



Das Peroxidase-gekoppelte Anti-Human-IgG bindet an die EBNA-1-spezifischen IgG-Antikörper (P = Peroxidase).



Inkubation mit TMB-Substrat (\*). Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure. Die Auswertung erfolgt photometrisch.

### Testvorteile

- ☞ Durch das Pipettier-Kontroll-System kann jeder einzelne Pipettierschritt durch Farbumschlag visuell überprüft werden.
- ☞ Die brechbaren Mikrotiterstreifen gewährleisten eine optimale Testauslastung.
- ☞ Automatisierbar auf offenen ELISA-Gerätesystemen.
- ☞ Ein-Punkt-Quantifizierung, keine Standardkurve mehr nötig.

## PACKUNGSIHALT

### KAT.-NR.: 126-PKS

1. 

<b>MTP</b>
------------

Mikrotiterplatte: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen, blau-markiert (mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt), brechbar, Rundboden, beschichtet mit rekombinantem EBV EBNA-1-Antigen, BSA und pH-Indikator, gebrauchsfertig.
2. 

<b>CONTROL</b>	<b>-</b>
----------------	----------

Negative Kontrolle: 2 Fläschchen à 0,75 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
3. 

<b>CONTROL</b>	<b>+</b>
----------------	----------

Positive Kontrolle: 2 Fläschchen à 0,75 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält FKS, BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
4. 

<b>CAL</b>
------------

Kalibrator: 2 Fläschchen à 0,75 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält FKS, BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
5. 

<b>WB</b>
-----------

Waschpuffer: 1 Flasche à 100 ml, PBS/Tween (10 x), pH 7,2 - 7,4, enthält ProClin™ 300.
6. 

<b>VIR-DIL</b>
----------------

Probenverdünnungspuffer: 1 Flasche à 110 ml, PBS/Tween/BSA, pH 7,2 - 7,4, gebrauchsfertig, enthält ProClin™ 300.
7. 

<b>CON</b>
------------

Konjugat: 3 Fläschchen à 5,0 ml, Ziege-Anti-Human-IgG-Antikörper, HRP-konjugiert, gebrauchsfertig, grün gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
8. 

<b>TMB</b>
------------

TMB-Substrat: 1 Fläschchen à 10 ml, gebrauchsfertig.
9. 

<b>STOP</b>
-------------

Stopplösung: 2 Fläschchen à 14 ml, 0,5 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), gebrauchsfertig.

## **1. LAGERUNG UND HALTBARKEIT**

<b>Material/Reagenz</b>	<b>Zustand</b>	<b>Lagerung</b>	<b>Haltbarkeit</b>
Testkit	ungeöffnet	2...8 °C	bis Verfalldatum
Mikrotiterplatte	geöffnet	2...8 °C im Beutel mit Trockenmittelpappe	6 Wochen
Kontrollen/ Kalibrator	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Waschpuffer	verdünnt	2...8 °C	6 Wochen
Probenverdünnungs- puffer	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Konjugat	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
TMB-Substrat	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Stopplösung	geöffnet	2...8 °C	bis Verfalldatum

Die Reagenzien sind nach Ablauf des angegebenen Verfalldatums nicht mehr zu verwenden.

## **2. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN**

- 2.1. Aqua ad iniectabilia (H<sub>2</sub>O bidest.). Die Verwendung von entionisiertem Wasser kann zu Störungen im Testsystem führen.
- 2.2. Mikroliterpipetten für entsprechende Volumina.
- 2.3. Saubere Glas- oder Kunststoffgefäße zum Verdünnen von Waschpuffer und Proben.
- 2.4. Geeignete Vorrichtung zum Waschen der Mikrotiterplatte (z. B. Multistepper oder ELISA-Waschgerät).
- 2.5. Inkubator für 37 °C.
- 2.6. Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern für 450 nm und 620 - 650 nm.

## **3. ANSETZEN DER REAGENZIEN**

Alle Kitkomponenten müssen vor Testansatz auf Raumtemperatur gebracht werden.

Ermitteln Sie die Anzahl der benötigten Mikrotitervertiefungen.

### 3.1. Mikrotiterplatte

Der Aluminiumbeutel muß nach jeder Entnahme zusammen mit der Trockenmittelpappe wieder fest verschlossen werden. Lagerung und Haltbarkeit der nicht verwendeten Mikrotitervertiefungen siehe unter 1.

**Hinweis:** Die Mikrotitervertiefungen weisen einen leicht grünlichen Farbton auf. Ggf. auftretende grünlich-braune Flecken in den Vertiefungen sind produktionsbedingt und stören den Test nicht.

### 3.2. Waschpuffer

1 Teil Waschpuffer (10 x) wird mit 9 Teilen Aqua ad iniectabilia angesetzt (z. B. 50 ml Waschpuffer (10 x) mit 450 ml Aqua ad iniectabilia). Für acht Vertiefungen werden 10 ml Waschpuffer benötigt.

**Evtl. im Waschpuffer (10 x) vorhandene Kristalle sind vor dem Ansetzen durch Erwärmen (max. 37 °C) und/oder Rühren bei RT in Lösung zu bringen.**

Die testspezifischen Reagenzien (Mikrotiterplatte, Kontrollen, Konjugat, Kalibrator) sind nicht mit denen anderer Chargen zu mischen. Im Gegensatz dazu sind Probenverdünnungspuffer, Waschpuffer, TMB-Substrat und Stopplösung für alle virologischen Tests von medac grundsätzlich austauschbar.

Reagenzien anderer Hersteller sind generell nicht einzusetzen.

Nur bei exakter Einhaltung der Arbeitsvorschrift werden valide und reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

## **4. UNTERSUCHUNGSMATERIAL**

4.1. Der Test ist geeignet zur Untersuchung von Serum.

4.2. Eine Vorbehandlung der Seren, wie z. B. Inaktivierung, ist nicht erforderlich, sie sollten jedoch nicht mikrobiell kontaminiert und frei von Humanerythrocyten sein.

4.3. Die Seren werden 1 : 200 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. Wir empfehlen, zunächst eine 1 : 50 Verdünnung herzustellen (z. B. 10 µl Serum + 490 µl Probenverdünnungspuffer) und nur die benötigte Menge 1 : 4 weiterzuverdünnen. Proben außerhalb des Meßbereiches können beliebig weiterverdünnt werden.

## **5.A. ARBEITSVORSCHRIFT**

- 5.1. Die Verpackung der Mikrotiterplatte am ZIP-Verschluß öffnen und die erforderliche Anzahl Mikrotitervertiefungen entnehmen (s. 3.1.).

**Die Mikrotitervertiefungen sind gebrauchsfertig und müssen nicht vorgewaschen werden.**

- 5.2. Die Vertiefung A1 bleibt frei für die Ermittlung des Leerwertes (s. 6.A.). Jeweils 50 µl der negativen Kontrolle, der positiven Kontrolle sowie der Proben in Einfachbestimmung und 50 µl des Kalibrators in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Platte pipettieren.

**Nach dem Pipettieren der Proben (pH-neutrale bzw. basische Flüssigkeiten) kommt es zu einer Blau-/Grünfärbung. Erfolgt in einer Vertiefung kein Farbumschlag, so ist dies ein Hinweis darauf, daß keine Probe bzw. keine Kontrolle pipettiert wurde.**

**Ggf. kann die Platte bis zur weiteren Bearbeitung in einer feuchten Kammer für maximal 30 min bei RT gelagert werden.**

- 5.3. Die Mikrotitervertiefungen 60 min ( $\pm 5$  min) bei 37 °C ( $\pm 1$  °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.4. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen dreimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer waschen. Darauf achten, daß alle Vertiefungen beim Waschen gefüllt werden. Nach Beendigung des Waschvorganges Mikrotitervertiefungen auf Filterpapier ausklopfen.

**Nicht austrocknen lassen! Umgehend weiterverwenden!**

- 5.5. Konjugat (grün gefärbt) in alle Vertiefungen (außer A1) pipettieren.

**Beim manuellen Abarbeiten des Tests werden 50 µl Konjugat pro Vertiefung pipettiert.**

### **Bitte beachten:**

**Beim Arbeiten mit automatisierten Gerätesystemen ist auf Grund der höheren Verdunstung in den Inkubationskammern die Zugabe von 60 µl Konjugat pro Vertiefung zu programmieren.**

**Die grundsätzliche Eignung des Tests für die automatisierte Abarbeitung konnte im Rahmen der Validierung gezeigt werden. Dennoch empfehlen wir, die Kompatibilität mit dem zum Einsatz kommenden Gerätesystem zu verifizieren.**

- 5.6. Erneut 60 min ( $\pm$  5 min) bei 37 °C ( $\pm$  1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.7. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen erneut waschen (s. 5.4.).
- 5.8. 50  $\mu$ l TMB-Substrat in jede Vertiefung (auch A1) pipettieren und 30 min ( $\pm$  2 min) bei 37 °C ( $\pm$  1 °C) im Dunkeln inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt). Positive Proben erscheinen blau gefärbt.
- 5.9. Durch Zugabe von 100  $\mu$ l Stopplösung in jede Vertiefung (auch A1) wird die Reaktion gestoppt. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb.

**Mikrotitervertiefungen vor photometrischer Messung von unten abwischen und darauf achten, daß keine Luftblasen in den Vertiefungen vorhanden sind!**

**Die Messung ist innerhalb von 15 min nach dem Stoppen durchzuführen!**

**5.B. TABELLE ZUR ARBEITSVORSCHRIFT**

	Leerwert (A1)	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle	Kalibrator	Probe
Negative Kontrolle	-	50 $\mu$ l	-	-	-
Positive Kontrolle	-	-	50 $\mu$ l	-	-
Kalibrator	-	-	-	50 $\mu$ l	-
Probe	-	-	-	-	50 $\mu$ l
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 $\mu$ l Waschpuffer waschen					
Konjugat	-	50/60 $\mu$ l*)	50/60 $\mu$ l*)	50/60 $\mu$ l *)	50/60 $\mu$ l*)
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 $\mu$ l Waschpuffer waschen					
TMB-Substrat	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren					
Stopplösung	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Photometrische Auswertung bei 450 nm (Ref. 620-650 nm)					

\*) manuelle/automatisierte Abarbeitung (s.5.5.)

## 6.A. TESTBEURTEILUNG (VALIDITÄT)

- \* Die photometrische Auswertung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620 - 650 nm).
- \* Die OD des Leerwertes (Vertiefung A1) wird von allen OD-Werten subtrahiert.

### \* Chargenspezifische Daten

Dem Test liegt ein chargenspezifisches Datenblatt bei. Diesem können folgende Angaben entnommen werden:

- chargenspezifische Standardkurve
- Kurvenparameter a und b
- OD-Sollwert des Kalibrators
- unterer Grenzwert für die OD des Kalibrators
- Sollbereich in AU/ml für die positive Kontrolle

### \* Validitätskriterien

- Der OD-Wert der **negativen Kontrolle** muß **< 0,150** betragen.
- Der Unit-Wert der **positiven Kontrolle** muß innerhalb des Sollwertbereiches gemäß chargenspezifischem Datenblatt liegen.
- Der OD-Mittelwert des **Kalibrators** muß oberhalb des Grenzwertes gemäß chargenspezifischem Datenblatt liegen.

**Sind die genannten Validitätskriterien nicht erfüllt, muß der Test wiederholt werden!**

### \* Korrektur der Meßergebnisse

Die OD-Werte für die positive Kontrolle und die Patientenproben werden wie folgt korrigiert:

$$OD_{\text{korrigiert}} = \frac{\text{OD-Sollwert des Kalibrators}}{\text{OD-Meßwert des Kalibrators}} \times OD_{\text{gemessen}}$$

### \* Quantifizierung der Meßergebnisse

Für die korrigierten OD-Werte sind die korrespondierenden Konzentrationen in AU/ml aus der Standardkurve auf dem chargenspezifischen Datenblatt zu ermitteln.

Alternativ lassen sich die Konzentrationen auch mit der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Konzentration [AU/ml]} = b / \left( \frac{a}{OD_{\text{korrigiert}}} - 1 \right)$$

Die meisten ELISA-Photometer neuerer Bauart gestatten die Eingabe dieser Formel, so daß eine direkte Auswertung mittels Photometer möglich ist.

Der Meßbereich erstreckt sich von 9 bis 200 AU/ml. Proben mit Unit-Werten unterhalb des Meßbereiches sind als < 9 AU/ml zu bewerten, solche oberhalb als > 200 AU/ml. Diese dürfen nicht extrapoliert werden.

**Der Cut-off liegt bei 10 AU/ml.**

**Grenzbereich = Cut-off  $\pm$  10 % (= 9 bis 11 AU/ml)**

**Achtung! Wichtiger Hinweis!**

Bedingt durch den mathematischen Algorithmus der quantitativen Auswertung können in folgenden Fällen negative oder nicht definierte AU-Werte erhalten werden:

- Bei stark positiven Proben mit korrigierten OD-Werten  $\geq a$  erhält man negative oder nicht definierte AU-Werte (nicht erlaubte Division durch 0.) Diese Proben sind in einer höheren Verdünnung nachzutesten oder als > 200 AU/ml zu bewerten.

**6.B. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE/GRENZEN DER METHODE**

\* Proben mit Unit-Werten unterhalb des Grenzbereiches werden als **NEGATIV** bewertet.

\* Proben mit Unit-Werten innerhalb des Grenzbereiches werden als **GRENZWERTIG** bewertet.

Diese Werte sollten kontrolliert werden, indem nach 14 Tagen eine zusätzliche Patientenprobe entnommen wird, die zusammen mit der ersten Probe auf eine Titerbewegung untersucht wird.

\* Proben mit Unit-Werten oberhalb des Grenzbereiches werden als **POSITIV** bewertet.

\* Die Testergebnisse sollten stets im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der Patienten und weiteren diagnostischen Parametern interpretiert werden.

\* Sehr stark erhöhte Lipidwerte können die gemessene Antikörperkonzentration verfälschen.  
Hohe Hämoglobinkonzentrationen beeinflussen die Testergebnisse nicht.

## 7. LEISTUNGSMERKMALE

Die nachfolgenden Leistungsmerkmale wurden von uns im Rahmen der diagnostischen Evaluierung ermittelt.

### 7.A. SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Im Rahmen der diagnostischen Erprobung wurden 165 Proben im Vergleich zur diagnostischen Bewertung aus dem Labor Frau Prof. Dr. Enders und Kollegen, Stuttgart, gemessen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Neun-Felder-Tafel dargestellt:

		Bewertung Prof. Enders		
		negativ	grenzwertig	positiv
EBV EBNA-1-IgG-ELISA PKS medac	negativ	114	0	0
	grenzwertig	0	0	0
	positiv	1	0	50

Sensitivität = 100 %  
Spezifität = 99,1 %

Negativer Vorhersagewert: 100 %  
Positiver Vorhersagewert: 98 %  
Übereinstimmung 99,4 %

### 7.B. PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz			
	MW AU	S	VK (%)	n		MW AU	S	VK (%)	n
PK	19,4	0,6	3	22	PK	19,6	0,5	2	11
Nr. 1	6,9	0,3	4	22	Nr. 6	7,3	0,3	4	11
Nr. 2	12,5	0,5	4	22	Nr. 7	13,4	0,6	4	11
Nr. 3	53,0	2,6	5	22	Nr. 8	50,4	3,9	8	11
Nr. 4	88,7	4,1	5	22	Nr. 9	96,5	7,1	7	11
Nr. 5	141,8	6,6	5	22	Nr. 10	155,0	13,6	9	11

PK = Positive Kontrolle

## **ALLGEMEINE HANDHABUNGSHINWEISE**

- \* Reagenzienflaschen und deren Verschlüsse nicht vertauschen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- \* Sofort nach Gebrauch die Reagenzflaschen wieder fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- \* Nach Gebrauch sind die Reagenzien sofort wieder, entsprechend den vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen, zu lagern, um die angegebene Haltbarkeit zu gewährleisten.
- \* Um Verwechslungen mit Reagenzien anderer Testsysteme oder Chargen zu vermeiden, sollten alle Kitkomponenten einer Testpackung nach dem Gebrauch zusammen in der Originalpackung gelagert werden (siehe auch 3.).

## **SICHERHEITSHINWEISE**

- \* Die national verbindlichen Arbeitsschutzvorschriften sind zu beachten.
- \* Die Reagenzien humanen Ursprungs wurden auf HBsAg, Anti-HIV 1/2 und Anti-HCV untersucht und für nicht reaktiv befunden. Dennoch sollten diese Reagenzien wie auch jene, die Bestandteile tierischer Herkunft enthalten (siehe Packungsinhalt), als potentiell infektiös behandelt werden, um das Risiko einer Ansteckung zu vermeiden.

## **ENTSORGUNGSHINWEISE**

Die in diesem Produkt enthaltenen Chemikalien und Zubereitungen sowie die bei der Anwendung dieses Produktes anfallenden Reste sind in der Regel Abfälle, die einer ordnungsgemäßen Entsorgung zugeführt werden müssen.

Die Entsorgung solcher Abfälle unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde oder Abfallentsorgungsunternehmen informieren über die Entsorgungsmöglichkeiten.

**Ausgabedatum: 01.08.2005**

**EBV EBNA-1-IgG-ELISA PCS medac**

Enzyme immunoassay with **Pipetting Control System** (PCS) for the quantitative detection of IgG antibodies to Epstein-Barr virus specific nuclear antigen-1 (EBNA-1) in serum

Cat. no.: 126-PKS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

**INTRODUCTION**

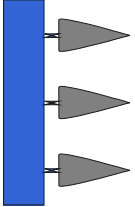
*Epstein-Barr virus (EBV)* belongs to the family of *Herpesviridae*. It consists of a double-stranded DNA genome, capsid, tegument and envelope. It is characteristic for EBV to persist latently and lifelong in the organism after primary infection.

90 to 95 % of all adult individuals are infected with EBV worldwide. The course, EBV primary infections take in immunocompetent individuals in early childhood, is normally without any symptoms. In individuals who suffer from minor immunosuppression a clinically silent reactivation of the virus may occur. In young adults an EBV infection clinically manifests as glandular fever (Pfeiffer's disease). In individuals who suffer from massive immunosuppression EBV associated polyclonal B-cell lymphomas are observed. In 60 % of all Hodgkin lymphomas EBV-DNA is present. Endemically relevant EBV-associated tumor disease are Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma.

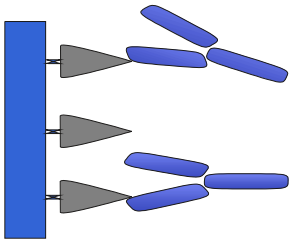
Relevant antigen complexes for antibody detection are the EBV-specific nuclear antigen (EBNA), the virus capsid antigen (VCA) and the early antigen (EA). In immunocompetent individuals antibody detection for distinction of primary infection towards previous infection or seronegativity is the focus of EBV diagnosis. EBV serology may be of importance as additional diagnostic of lymphadenopathy and of unclear neurological disease. In the context with a relevant EBV serology EBNA-1-IgG determination is the first step. A positive result confirms a previous infection. In the case of a negative EBNA-1-IgG, the determination of VCA-IgG and -IgM is essential to differentiate the status of infection.

The EBV EBNA-1-IgG-ELISA PCS medac detects IgG antibodies specifically directed against the EBNA-1. The test can be carried out fast and easily. By using a calibration curve it is possible to quantify the antibody concentration allowing a reliable follow up.

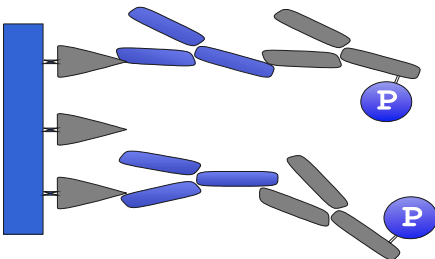
## TEST PRINCIPLE



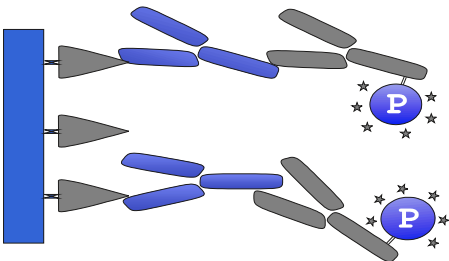
The plate is coated with EBV EBNA-1 virus antigen.



The EBNA-1-specific antibodies from the specimen are selectively bound to the antigen.



Peroxidase-conjugated anti-human IgG antibodies bind to the EBNA-1-specific IgG antibodies (P = peroxidase).



Incubation with TMB-substrate (\*). The reaction is stopped by the addition of sulfuric acid. The absorption is read photometrically.

### Advantages of the test

- ☞ The Pipetting Control System allows to monitor visually each pipetting step through colour changes.
- ☞ The breakable microwell strips permit efficient use of the test.
- ☞ Suitable for automation on open ELISA devices.
- ☞ Single-point quantification, no standard curve needed.

## **KIT CONTENTS**

**Cat. no.: 126-PKS**

1. 

<b>MTP</b>
------------

Microplate: 12 x 8 wells, blue-coded (with frame and desiccant vacuum sealed in aluminium bag), breakable, U-form, coated with recombinant EBV EBNA-1 virus antigen, BSA and pH indicator, ready to use.
2. 

<b>CONTROL</b>	<b>-</b>
----------------	----------

Negative control: 2 vials with 0.75 ml each, human serum, ready to use, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
3. 

<b>CONTROL</b>	<b>+</b>
----------------	----------

Positive control: 2 vials with 0.75 ml each, human serum, ready to use, contains FCS, BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
4. 

<b>CAL</b>
------------

Calibrator: 2 vials with 0.75 ml each, human serum, ready to use, contains FCS, BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
5. 

<b>WB</b>
-----------

Wash buffer: 1 bottle with 100 ml, PBS/Tween (10 x), pH 7.2 - 7.4, contains ProClin™ 300.
6. 

<b>VIR-DIL</b>
----------------

Sample diluent: 1 bottle with 110 ml, PBS/Tween/BSA, pH 7.2 - 7.4, ready to use, contains ProClin™ 300.
7. 

<b>CON</b>
------------

Conjugate: 3 vials with 5.0 ml each, goat anti-human IgG, HRP-conjugated, ready to use, stained green, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
8. 

<b>TMB</b>
------------

TMB-substrate: 1 vial with 10 ml, ready to use.
9. 

<b>STOP</b>
-------------

Stop solution: 2 vials with 14 ml each, 0.5 M sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ready to use.

## **1. STORAGE AND STABILITY**

<b>MATERIAL/REAGENT</b>	<b>STATE</b>	<b>STORAGE</b>	<b>STABILITY</b>
Test kit	unopened	2...8°C	until expiry date
Microplate	opened	2...8°C in bag with desiccant	6 weeks
Controls/ Calibrator	opened	2...8°C	6 weeks
Wash buffer	diluted	2...8°C	6 weeks
Sample diluent	opened	2...8°C	6 weeks
Conjugate	opened	2...8°C	6 weeks
TMB-substrate	opened	2...8°C	6 weeks
Stop solution	opened	2...8°C	until expiry date

Do not use the reagents after the expiry date.

## **2. REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

- 2.1. Water for injection (H<sub>2</sub>O redist.). Use of deionised water can disturb the test procedure.
- 2.2. Adjustable micropipettes.
- 2.3. Clean glass or plastic containers for dilution of wash buffer and specimen.
- 2.4. Suitable device for microplate washing (e.g. multistepper or ELISA washer).
- 2.5. Incubator for 37 °C.
- 2.6. Microplate reader with filters for 450 nm and 620 - 650 nm.

## **3. PREPARATION OF THE REAGENTS**

Before starting the test procedure all kit components must be equilibrated to room temperature.

Calculate the number of wells required.

### 3.1. Microplate

The aluminium bag has to be tightly resealed together with the desiccant after each removal of wells. Storage and stability of the wells are indicated below point 1.

**Note: The microplate wells have a light green colour. Possibly occurring greenish brown stains inside the wells are due to the production process and do not influence the test performance.**

### 3.2. Wash buffer

Mix one volume of wash buffer (10 x) with nine volumes of water for injection (e.g. 50 ml wash buffer (10 x) with 450 ml water). 10 ml of diluted wash buffer are needed for eight wells.

**Crystals in the wash buffer (10 x) have to be dissolved by warming (max. 37 °C) and/or stirring at RT.**

**Do not mix test specific reagents (microplate, controls, conjugate, calibrator) from different kit lots.**

**In contrast to that sample diluent, wash buffer, TMB-substrate and stop solution are generally exchangeable in all virological ELISA medac.**

**Reagents from other manufacturers must not be used in general.**

**Valid and reproducible results are only obtained if the test procedure is precisely followed.**

## **4. SPECIMEN**

4.1. The test is suitable for serum.

4.2. Pretreatment of sera, e.g. inactivation, is not necessary. However, they should neither be contaminated with microorganisms nor contain any red blood cells.

4.3. Sera have to be diluted 1 : 200 with sample diluent. We recommend to prepare an initial dilution of 1 : 50 (e.g. 10 µl serum + 490 µl sample diluent). For further 1 : 4 dilution just prepare the volume needed. Samples outside the measuring range can be diluted further.

## **5.A. TEST PROCEDURE**

5.1. Cut the aluminium bag above the zip fastener and take out the required number of microplate wells (see 3.1.).

**Microplate wells are ready to use and do not have to be pre-washed.**

5.2. Leave well A1 empty as blank (see 6.A.). Add 50 µl each of the negative control, the positive control as well as the diluted

samples in single determination, and 50 µl of the calibrator in duplicate to the wells.

**After pipetting the samples (pH neutral or basic fluid) the wells turn blue/green. A missing colour change in one well indicates that no sample or control has been added.**

**If necessary, the microplate wells can be kept in a humid chamber up to 30 min at RT before proceeding.**

5.3. Incubate the microplate wells for 60 min ( $\pm$  5 min) at 37 °C ( $\pm$  1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.

5.4. After incubation wash the microplate wells three times with 200 µl wash buffer per well. Pay attention that all wells are filled. After washing tap microplate wells on filter paper.

**Do not allow the wells to dry out! Proceed immediately!**

5.5. Add conjugate (coloured green) to each well (except A1).

**50 µl of conjugate have to be pipetted into the wells if the test is done manually.**

**Please note:**

**When working with automated devices, 60 µl of conjugate have to be pipetted into each well due to a higher evaporation in the incubation chambers of the devices.**

**The suitability of the test for automated devices was confirmed during the evaluation of the test. Nevertheless we recommend to verify the compatibility of the test with the devices used in the lab.**

5.6. Incubate again for 60 min ( $\pm$  5 min) at 37 °C ( $\pm$  1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.

5.7. After incubation wash microplate wells again (see 5.4.).

5.8. Add 50 µl of TMB-substrate to each well (also A1) and incubate for 30 min ( $\pm$  2 min) at 37 °C ( $\pm$  1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil in the dark. Positive samples turn blue.

5.9. Stop the reaction by adding 100 µl of stop solution to each well (also A1). Positive samples turn yellow.

Clean microplate wells from underneath before the photometric reading and take care that there are no air bubbles in the wells.

The reading should be done within 15 min after adding the stop solution!

#### 5.B. TABLE FOR THE TEST PROCEDURE

	Blank (A1)	Negative control	Positive control	Calibrator	Sample
Neg. control	-	50 µl	-	-	-
Pos. control	-	-	50 µl	-	-
Calibrator	-	-	-	50 µl	-
Sample	-	-	-	-	50 µl
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 µl wash buffer					
Conjugate	-	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)	50/60 µl *)
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 µl wash buffer					
TMB-substrate	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Incubate for 30 min at 37 °C in the dark					
Stop solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometric reading at 450 nm (ref. 620 - 650 nm)					

\*) manual/automatic procedure (see 5.5.)

#### 6.A. CALCULATION OF RESULTS (VALIDITY)

- \* Read OD values at 450 nm (reference wavelength 620 - 650 nm).
- \* Subtract the OD value of the blank (well A1) from all other OD values.
- \* Lot-specific data  
The lot-specific data sheet provided with the kit contains the following information:
  - Lot-specific calibration curve
  - Curve parameters a and b
  - Nominal OD value of the calibrator
  - Lower OD limit of the calibrator
  - Nominal concentration range (AU/ml) of the positive control
- \* Validity criteria
  - The OD value of the **negative control** has to be **< 0.150**.
  - The unit value of the **positive control** has to be within the nominal range indicated in the lot-specific data sheet.

- The mean OD value of the **calibrator** has to be above the lower OD limit indicated in the lot-specific data sheet.

**Repeat the run if the results do not meet the specification!**

\* Correction of the results

The measured OD value of the positive control and the samples have to be corrected as follows:

$$OD_{\text{corrected}} = \frac{\text{Nominal OD value of the calibrator}}{\text{Measured OD value of the calibrator}} \times OD_{\text{measured}}$$

\* Quantification of the results

The corresponding concentrations of the corrected OD values in AU/ml can be read from the lot-specific calibration curve (see lot-specific data sheet).

Alternatively, the concentrations can be calculated using the following formula:

$$\text{Concentration [AU/ml]} = b / \left( \frac{a}{OD_{\text{corrected}}} - 1 \right)$$

Most of the new ELISA readers allow to program the formula, thus enabling an automated data processing.

The measuring range spans from 9 to 200 AU/ml. Samples below this range have to be interpreted as < 9 AU/ml, those above as > 200 AU/ml. These values must not be extrapolated.

**The cut-off is 10 AU/ml.**

**Grey zone = cut-off ± 10 % (= 9 to 11 AU/ml).**

**Attention! Important Note!**

Due to the mathematical algorithm of the quantification negative or not defined AU values can be obtained in the following cases:

- Highly positive samples with corrected OD-values  $\geq a$  are calculated as negative or not defined AU values (not allowed division by 0). These samples have to be retested in higher dilutions or have to be interpreted as > 200 AU/ml.

**6.B. INTERPRETATION OF RESULTS/LIMITATIONS OF THE METHOD**

- \* Samples with Unit values below the lower limit of the grey zone are reported as **NEGATIVE**.

\* Samples with Unit values within the grey zone are reported as **EQUIVOCAL**.

These samples should be retested together with a fresh specimen taken 14 days later in order to determine a titer change.

\* Samples with Unit values exceeding the upper limit of the grey zone are reported as **POSITIVE**.

\* The results should always be interpreted in connection with clinical data and additional diagnostic parameters.

\* Very high concentrations of lipids in samples can influence the measured concentration of antibodies.  
High concentrations of hemoglobin do not influence the test results.

## **7. PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

We determined the following performance characteristics during the diagnostic evaluation.

### **7.A. SENSITIVITY AND SPECIFICITY**

165 sera were measured during the diagnostic evaluation. The results were correlated with the diagnostical characterization of the lab Prof. Dr. Enders and Colleagues, Stuttgart. The results are shown in the table below:

		<b>Results Prof. Enders</b>		
		negative	cut-off	positive
<b>EBV EBNA-1-IgG-ELISA</b> <b>PCS medac</b>	negative	114	0	0
	cut-off	0	0	0
	positive	1	0	50

Sensitivity = 100 %  
Specificity = 99.1 %

Negative predictive value: 100 %  
Positive predictive value: 98 %  
Concordance: 99.4 %

## **7.B. PRECISION**

Sample	Intra-assay variation				Sample	Interassay variation			
	mean AU	SD	CV (%)	n		mean AU	SD	CV (%)	n
PC	19.4	0.6	3	22	PC	19.6	0.5	2	11
N° 1	6.9	0.3	4	22	N° 6	7.3	0.3	4	11
N° 2	12.5	0.5	4	22	N° 7	13.4	0.6	4	11
N° 3	53.0	2.6	5	22	N° 8	50.4	3.9	8	11
N° 4	88.7	4.1	5	22	N° 9	96.5	7.1	7	11
N° 5	141.8	6.6	5	22	N° 10	155.0	13.6	9	11

PC = Positive control

### **GENERAL HANDLING ADVICES**

- \* To avoid cross contamination do not exchange the vials and their screw caps.
- \* The reagents have to be sealed immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- \* After use, the reagents have to be stored as indicated to guarantee the shelf life.
- \* After use, all components of the testkit should be stored in the original package, in order to avoid mixing up the reagents of other test systems or lots (see also 3.).

### **HEALTH AND SAFETY INFORMATION**

- \* The local occupational safety and health regulations have to be regarded.
- \* Reagents of human origin have been tested and found to be negative for HBsAg, for antibodies to HIV-1/2 and to HCV. Nevertheless, it is strongly recommended that these materials as well as those of animal origin (see kit contents), should be handled as potentially infectious and used with all necessary precautions.

### **DISPOSAL CONSIDERATIONS**

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

**Date of issue: 01.08.2005**

### **EBV EBNA-1-IgG-ELISA PCS medac**

Immunoessai enzymatique avec **Système de Contrôle de Pipettage (PCS)** pour la détection quantitative des anticorps IgG anti antigène-1 spécifique du noyau du virus Epstein-Barr (EBNA-1) dans le sérum.

Cat. no.: 126-PKS

DESTINE UNIQUEMENT AU DIAGNOSTIC IN VITRO

#### **INTRODUCTION**

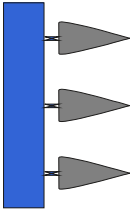
Le virus Epstein-Barr (EBV) appartient à la famille des *Herpesviridae*. Il consiste en un génome à double brin d'ADN, capsid, tégument et enveloppe. Il est caractéristique pour l'EBV de persister de manière latente et pendant toute la vie dans l'organisme après une infection primaire.

90 à 95 % de tous les individus adultes sont infectés par l'EBV dans le monde. L'évolution des infections primaires à EBV chez des individus immunocompétents lors de la prime enfance est normalement sans aucun symptôme. Chez les individus qui souffrent d'une immunosuppression mineure, une réactivation cliniquement silencieuse du virus peut apparaître. Chez les adultes jeunes, une infection à EBV se manifeste cliniquement par une mononucléose infectieuse (maladie de Pfeiffer). Chez les individus qui souffrent d'une immunosuppression importante associée aux cellules B polyclonales, peuvent être observés des lymphomes. Dans 60 % de tous les lymphomes de Hodgkin, de l'ADN-EBV est présent. Des maladies tumorales endémiques en rapport avec EBV sont le lymphome de Burkitt et le carcinome nasopharyngé.

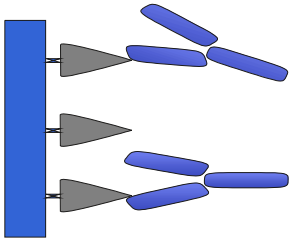
Des complexes antigéniques significatifs pour la détection des anticorps sont l'antigène nucléaire spécifique de EBV (EBNA), l'antigène de capsid viral (VCA) et l'antigène précoce (EA). Chez les individus immunocompétents, la détection des anticorps pour distinguer une infection primaire d'une infection antérieure ou la séronégativité est le but du diagnostic de l'EBV. La sérologie à EBV peut être importante comme diagnostic complémentaire d'une lympho-adénopathie et d'une maladie neurologique indéterminée. Dans le contexte d'une sérologie EBV significative, la détermination de EBNA-1-IgG est la première étape. Un résultat positif confirme une infection antérieure. Dans le cas d'un résultat EBNA-1-IgG négatif, la détermination de VCA-IgG et -IgM est essentiel pour différencier le stade de l'infection.

Le kit EBV EBNA-1-IgG-ELISA PCS medac détecte les anticorps IgG dirigés de manière spécifique contre EBNA-1. Le test peut être réalisé rapidement et facilement. Par l'utilisation d'une courbe de calibration il est possible de quantifier la concentration en anticorps permettant un suivi fiable.

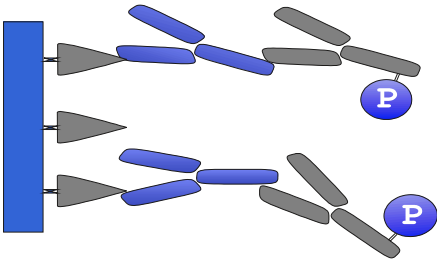
## PRINCIPE DU TEST



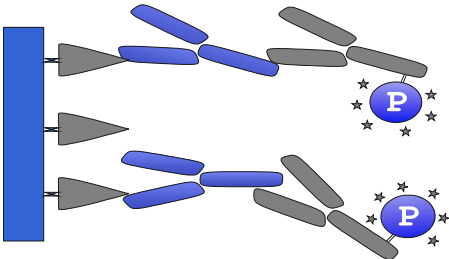
La plaque est revêtue d'antigène EBNA-1 recombinant du virus EBV.



Les anticorps spécifiques anti EBNA-1 présents dans l'échantillon vont se lier sélectivement à l'antigène.



Les anticorps anti-IgG humains conjugués à la peroxidase vont se lier aux anticorps spécifiques IgG anti- EBNA-1 ( P = peroxidase)



Incubation avec TMB-substrat(\*). La réaction est arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique. L'absorption est lue sur un spectrophotomètre.

### Avantages du dosage

- ☞ Le Système de Contrôle du Pipettage permet de suivre visuellement chaque étape au travers des changements de colorations.
- ☞ Micropuits sécables permettant l'utilisation optimale du test.
- ☞ Convient pour l'automatisation sur des appareils ELISA ouverts.
- ☞ Quantification en un point, pas de courbe standard nécessaire.

## CONTENU DE LA TROUSSE

RÉF. : 126-PKS

1. 

<b>MTP</b>
------------

Microplaque: 12 x 8 puits, de couleur bleue (avec support et déshydratant, dans un sachet d'aluminium scellé sous vide), sécables, en forme de U, recouverts d'antigène viral recombinant EBV EBNA-1, BSA et un indicateur de pH, prêts à l'emploi.
2. 

<b>CONTROL</b>	<b>-</b>
----------------	----------

Contrôle négatif: 2 flacons de 0,75 ml chacun, contenant du sérum humain, prêt à l'emploi, de la BSA, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate gentamycine.
3. 

<b>CONTROL</b>	<b>+</b>
----------------	----------

Contrôle positif: 2 flacons de 0,75 ml chacun, contenant du sérum humain, prêt à l'emploi, contient du sérum fœtal de veau, de la BSA, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamycine.
4. 

<b>CAL</b>
------------

Calibrateur: 2 flacons de 0,75 ml chacun, contenant du sérum humain, prêt à l'emploi, contient du sérum fœtal de veau, de la BSA, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamycine.
5. 

<b>WB</b>
-----------

Tampon de lavage: 1 flacon de 100 ml, contenant un tampon PBS/Tween (10 x), pH 7,2 - 7,4, contient du ProClin™ 300.
6. 

<b>VIR-DIL</b>
----------------

Diluant pour échantillons: 1 flacon de 110 ml, contenant une solution tamponnée PBS/Tween/BSA, pH 7,2 - 7,4, prête à l'emploi, contient du ProClin™ 300.
7. 

<b>CON</b>
------------

Conjugué: 3 flacons de 5,0 ml chacun, contenant une solution d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines conjuguées à de la peroxydase du raifort (HRP), prête à l'emploi, de couleur verte, contient de la BSA, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamycine.
8. 

<b>TMB</b>
------------

TMB-substrat: 1 flacon de 10 ml, prêt à l'emploi.
9. 

<b>STOP</b>
-------------

Solution d'arrêt: 2 flacons de 14 ml chacun, contenant de l'acide sulfurique 0,5 M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), prêt à l'emploi.

## **1. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS**

<b>MATERIEL/REACTIF</b>	<b>ETAT</b>	<b>CONSERVATION</b>	<b>STABILITE</b>
Trousse	non ouvert	2...8°C	Jusqu'à la date de péremption.
Microplaque	ouvert	2...8°C dans le sachet, avec déshydratant	6 semaines
Contrôles/ Calibrateur	ouvert	2...8°C	6 semaines
Tampon de lavage	dilué	2...8°C	6 semaines
Diluant pour échantillons	ouvert	2...8°C	6 semaines
Conjugué	ouvert	2...8°C	6 semaines
TMB-substrat	ouvert	2...8°C	6 semaines
Solution d'arrêt	ouvert	2...8°C	Jusqu'à la date de péremption

Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.

## **2. REACTIFS ET MATERIELS NECESSAIRES MAIS NON FOURNI**

- 2.1. Eau pour injection ( bidistillée). L'utilisation d'eau désionisée peut perturber la procédure du test.
- 2.2. Micropipettes réglables.
- 2.3. Récipients propres en plastique ou en verre pour la dilution du tampon de lavage et des échantillons.
- 2.4. Dispositif de lavage des microplaques (par exemple multistepper ou ELISA washer).
- 2.5. Incubateur à 37 °C.
- 2.6. Lecteur de plaque avec filtres à 450 nm et 620 - 650 nm.

## **3. PREPARATION DES REACTIFS**

Avant de démarrer la procédure de dosage, tous les composants de la trousse doivent être amenés à température ambiante.

Calculer le nombre de puits nécessaire.

### 3.1. Microplaque

Le sachet aluminium avec le dessicant doit être soigneusement refermé après avoir retiré les puits. La conservation et la stabilité des puits sont indiqués au point 1.

**Remarque: Les puits de la microplaque possèdent des reflets verts. Des aspects de couleur marrons verts peuvent être présents dans les puits, ceci est dû à la procédure de production et n'influencent pas les performances du test.**

### 3.2. Tampon de lavage

Mélanger un volume de tampon de lavage (10 x) avec neuf volumes d'eau pour injection ( par ex. 50 ml de tampon de lavage (10 x) avec 450 ml d'eau).

10 ml de tampon dilué sont nécessaires pour 8 puits.

**Des cristaux dans le tampon de lavage (10 x) doivent être dissous en chauffant (max. 37 °C) et/ou en agitant, à température ambiante.**

**Ne pas mélanger les réactifs spécifiques du test (microplaque, contrôles, conjugué, calibrateur) de différents lots.**

**Par contre, le diluant pour échantillons, le tampon de lavage, le TMB-substrat et la solution d'arrêt sont interchangeables dans tous les tests virologiques ELISA de medac.**

**Des réactifs d'autres fabricants ne peuvent pas être utilisés.**

**Des résultats valides et reproductibles sont obtenus uniquement en suivant strictement la notice d'emploi.**

## **4. ECHANTILLONS**

4.1. Le test est à utiliser avec du sérum.

4.2. Un pré-traitement des échantillons, par ex: l'inactivation n'est pas nécessaire. Cependant, il ne peuvent pas être contaminés par des microorganismes ou contenir des globules rouges.

4.3. Les séra doivent être dilués au 1 :200 avec le diluant pour échantillon. Nous recommandons de préparer une dilution initiale de 1 : 50 (par ex. 10 µl de sérum + 490 µl de diluant pour échantillon). Pour une dilution ultérieure de 1 : 4 , préparer le volume nécessaire. Les échantillons en dehors de la gamme de mesure peuvent être dilués ultérieurement.

## **5.A. MODE OPERATOIRE**

- 5.1. Couper le sachet aluminium au-dessus de la fermeture à glissière et extraire le nombre de puits nécessaire ( voir 3.1.).

**Les puits sont prêts à l'emploi et ne doivent pas être prélavés.**

- 5.2. Laisser la cupule A1 vide pour le blanc (voir 6.A.). Ajouter 50 µl de chaque contrôle négatif, contrôle positif et échantillons dilués en simple et 50 µl de calibrateur en double dans les cupules.

**Une couleur bleue doit apparaître dans tous les puits (sauf pour le puits A1) après la distribution des échantillons (liquides pH neutre ou basique). L'absence d'un changement de couleur peut indiquer qu'aucun échantillon ou contrôle n'a été ajouté.**

**Si nécessaire, la microplaque peut, à ce stade de la technique, être conservée dans une chambre humide jusqu'à 30 min à température ambiante.**

- 5.3. Incuber la microplaque pendant 60 min ( $\pm$  5 min) à 37 °C ( $\pm$  1 °C), dans une chambre humide ou la couvrir à l'aide d'un film pour incubation.
- 5.4. Après l'incubation, laver 3 fois la microplaque avec 200 µl de tampon de lavage par cupule. Faire attention à ce que toutes les cupules soient bien remplies. Après le lavage, tapoter la microplaque sur du papier absorbant.

**Ne pas laisser sécher les puits ! Passer immédiatement à l'étape suivante.**

- 5.5. Ajouter le conjugué (de couleur verte) dans chaque puits (excepté A1).

**50 µl de conjugué sont à distribuer dans les cupules si le test est réalisé manuellement.**

### **Remarque:**

**Quand le test est réalisé avec un automate de microplaque, 60 µl de conjugué doivent être distribués dans chaque cupule à cause de l'évaporation importante dans les chambres d'incubation d'un appareil.**

**L'utilisation du test sur les appareils automatiques a été validée pendant l'évaluation du test. Néanmoins nous recommandons de vérifier la compatibilité du dosage avec les appareils utilisés dans le laboratoire.**

- 5.6. Incuber à nouveau la plaque 60 min ( $\pm$  5 min) à 37 °C ( $\pm$  1 °C), dans une chambre humide ou couvrir la microplaque à l'aide d'un film pour incubation.
- 5.7. Après l'incubation, laver 3 fois la microplaque (voir 5.4.).
- 5.8. Ajouter 50  $\mu$ l de TMB-substrat dans chaque cupule (aussi A1) et incuber 30 min ( $\pm$  2 min) à 37 °C ( $\pm$  1 °C) dans une chambre humide ou couvrir à l'aide d'un film pour incubation dans l'obscurité. Les échantillons positifs virent au bleu.
- 5.9. Arrêter la réaction en ajoutant 100  $\mu$ l de solution d'arrêt dans chaque cupule (également A1). Les échantillons positifs virent au jaune.

**Essuyer soigneusement le dessous de la plaque avant la lecture photométrique et vérifier l'absence de bulles d'air dans les cupules.**

**La lecture doit être réalisée endéans les 15 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction.**

#### **5.B. TABLEAU DE DISTRIBUTION DES REACTIFS**

	Blanc (A1)	Contrôle négatif	Contrôle positif	Calibrateur	Echantillon
Contrôle nég.	-	50 $\mu$ l	-	-	-
Contrôle pos.	-	-	50 $\mu$ l	-	-
Calibrateur	-	-	-	50 $\mu$ l	-
Echantillon	-	-	-	-	50 $\mu$ l
Incuber pendant 60 min à 37 °C, laver 3 x avec 200 $\mu$ l tampon de lavage					
Conjugué	-	50/60 $\mu$ l *)	50/60 $\mu$ l *)	50/60 $\mu$ l *)	50/60 $\mu$ l *)
Incuber 60 min à 37 °C, laver 3 x avec 200 $\mu$ l tampon de lavage					
TMB-substrat	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Incuber 30 min à 37 °C dans l'obscurité					
Solution d'arrêt	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Lecture photométrique à 450 nm (ref. 620 - 650 nm)					

\* procédure manuelle/automatique (voir 5.5.)

## 6.A. CALCUL DES RESULTATS ( VALIDITE)

- \* Lire les valeurs de DO à 450 nm ( référence de 620 - 650 nm).
- \* Soustraire la valeur de DO du puit blanc (puit A1.) de toutes les autres valeurs de DO.
  
- \* Données spécifiques du lot  
La feuille de données spécifiques du lot fournie avec la trousse contient les informations suivantes :
  - Courbe de calibration spécifique du lot.
  - Paramètres a et b de la courbe.
  - Valeur de DO nominale du calibrateur.
  - DO limite inférieure du calibrateur.
  - Intervalle de concentration (AU/ml) du contrôle positif.
  
- \* Critères de validité
  - La DO du **contrôle négatif** doit être **< 0,150**.
  - La valeur du **contrôle positif** doit être comprise dans l'intervalle indiqué sur la feuille de données spécifique du lot.
  - La moyenne des DO du **calibrateur** doit être supérieure à la limite indiquée sur la feuille de données spécifique du lot.

**Refaire la manipulation si les critère de validité ne sont pas respectés!**

- \* Correction des résultats  
Les valeurs des DO mesurées pour le contrôle positif et les échantillons doivent être corrigées selon la formule suivante :

$$DO_{\text{corrigée}} = \frac{\text{Valeur de DO nominale du calibrateur}}{\text{DO mesurée du calibrateur}} \times DO_{\text{mesurée}}$$

- \* Quantification des résultats  
Les concentrations correspondantes au valeurs des DO corrigées (en AU/ml) peuvent être lues sur la courbe de calibration spécifique au lot utilisé (voir feuille de données spécifiques à chaque lot utilisé).

Alternativement, les concentrations peuvent-être calculées en utilisant la formule suivante :

$$\text{Concentration [UA/ml]} = b \left( \frac{a}{DO_{\text{corrigée}}} - 1 \right)$$

La programmation de cette formule est réalisable sur la plupart des lecteurs de microplaque permettant un calcul automatique des concentrations.

L'intervalle de mesure est compris entre 9 et 200 AU/ml. Les échantillons trouvés en-dessous de ces valeurs sont interprétés comme < 9 AU/ml , ceux au-dessus comme > 200 AU / ml. Ces valeurs ne peuvent pas être extrapolées.

**La valeur seuil est 10 AU/ml**

**Zone grise = valeur seuil  $\pm$  10 % (= 9 à 11 AU/ml).**

**Attention! Note importante!**

Lié à l'algorithme mathématique, une valeur négative ou non interprétable peut être obtenue dans les cas suivants:

- Un échantillon positif fort, avec une valeur de DO corrigée  $\geq$  a donne une valeur en UA/ml négative ou non interprétable (division par 0 impossible). Cet échantillon doit être retesté avec une dilution plus haute ou être interprété > 200 UA/ml.

**6.B.INTERPRETATION DES RESULTATS/ LIMITES DE LA METHODE**

\* Les échantillons ayant des valeurs en unités en dessous de la zone grise sont rendus **NEGATIFS**.

\* Les échantillons ayant des valeurs en unités dans la zone grise sont rendus **DOUTEUX**.

Ces échantillons sont à retester ensemble avec un deuxième prélèvement effectué 14 jours plus tard de manière à déterminer un changement de titre.

\* Les échantillons ayant des valeurs en unités dépassant la zone grise sont rendus **POSITIFS**.

\* Les résultats seront toujours interprétés en fonction du contexte clinique et l'addition de paramètres complémentaires de diagnostic.

\* De très hautes concentrations de lipides dans les échantillons peuvent influencer la concentration mesurée des anticorps.

Des concentrations élevées d'hémoglobine n'influencent pas les résultats.

## 7. CARACTERISTIQUES DES PERFORMANCES

Les performances suivantes ont été déterminées pendant l'évaluation diagnostique.

### 7.A. SENSIBILITE ET SPECIFICITE

165 séra ont été dosés pendant l'évaluation diagnostique. Les résultats ont été mis en corrélation avec la caractérisation diagnostique du laboratoire du Professeur Dr. Enders et Collègues, à Stuttgart. Les résultats sont montrés dans le tableau ci-dessous :

**Résultats Prof. Enders**

	négatifs	limite	positifs
<b>EBV EBNA-1-IgG-ELISA</b>			
négatifs	114	0	0
<b>PCS medac</b>			
limite	0	0	0
positifs	1	0	50

Sensibilité = 100 %  
Spécificité = 99,1 %

Valeur prédictive négative: 100 %  
Valeur prédictive positive: 98 %  
Concordance: 99,4 %

### 7.B. PRECISION

Echan- tillon	Variation intra-essai				Echan- tillon	Variation interessai			
	moyenne AU	SD	CV (%)	n		moyenne AU	SD	CV (%)	n
CP	19,4	0,6	3	22	CP	19,6	0,5	2	11
N° 1	6,9	0,3	4	22	N° 6	7,3	0,3	4	11
N° 2	12,5	0,5	4	22	N° 7	13,4	0,6	4	11
N° 3	53,0	2,6	5	22	N° 8	50,4	3,9	8	11
N° 4	88,7	4,1	5	22	N° 9	96,5	7,1	7	11
N° 5	141,8	6,6	5	22	N° 10	155,0	13,6	9	11

CP = contrôle positif

## **INDICATIONS GENERALES**

- \* Ne pas échanger les flacons et leurs bouchons pour éviter les contaminations croisées.
- \* Les flacons des réactifs doivent être refermés immédiatement après leur utilisation pour éviter l'évaporation et une contamination microbienne.
- \* Après emploi, les réactifs doivent être conservés comme indiqué pour garantir leur conservation.
- \* Après leur utilisation, conserver tous les composants de la trousse dans leur emballage d'origine, afin d'éviter le mélange des réactifs concernant d'autres techniques de dosage ou d'autres lots (voir aussi 3.).

## **PRECAUTIONS D'EMPLOI**

- \* Il faut appliquer la réglementation en vigueur en matière de sécurité et de santé.
- \* Les réactifs d'origine humaine ont été dosés et trouvés négatifs en AgHBs, en anticorps anti-HIV-1/2 et anti-VHC. Néanmoins, il est fortement conseillé de manipuler ces produits, ainsi que ceux d'origine animale (voir contenu de la trousse), comme étant potentiellement infectieux et de les utiliser avec les précautions nécessaires.

## **CONSEIL D'EVACUATION**

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'évacuation de ce type de déchets doit se faire selon la réglementation en vigueur. Il faut consulter les organismes agréés pour connaître le moyen de se débarrasser de ces déchets.

**Date de parution: 01.08.2005**

## LITERATUR/REFERENCES/LITTÉRATURE

Bauer, G.: Epstein-Barr-Virus - Bedeutung und Möglichkeiten der Labordiagnostik.  
Therapeutische Umschau 51(8), 558-562, (1994).

Bauer, G.: The rational basis for efficient Epstein-Barr Virus (EBV) serology. Clin. Lab. 41(9), 623-634, (1995).

Hille, A., Klein, K., Baumler, S., Grasser, F.A., Mueller-Lantzsch, N.: Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1, 2A and 2B in the baculovirus expression system: serological evaluation of human antibodies to these proteins. J. Med. Virol. 39 (3), 233-241, (1993).

Linde, A.: Diagnosis of Epstein-Barr Virus - related diseases. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 100, 83-88, (1996).

Mertens, T., Haller, O., Klenk, H.-D. (Hrsg.): Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten. 65-70, Urban & Fischer Verlag, (2004).

Modrow, S., Falke, D. (Hrsg.): Molekulare Virologie. 454-460, Spektrum Akademischer Verlag, (1997).

Prang, N.S., Schwarzmann, F.: Aktuelle Perspektiven in der Diagnostik Epstein-Barr-Virus assoziierter Erkrankungen. Immun. Infekt. 4, 144-151, (1997).