

EBV LINE

Line Immunoblot per IgG / IgM

N° articolo:

WE102G32 Line Immunoblot per IgG, 32 determinazioni
WE102G96 Line Immunoblot per IgG, 96 determinazioni
WE102M32 Line Immunoblot per IgM, 32 determinazioni
WE102M96 Line Immunoblot per IgM, 96 determinazioni

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

**Sekisui Virotech GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim
Tel.: +49-6142-6909-0
Fax: +49-6142-82621
<http://www.sekisuivirotech.com>**



Druckdatum 04.05.2011
REV 3 / EBV LINE IgG/IgM IT

Indice

| | |
|--|-----------|
| 1. Finalità d'uso | 3 |
| 2. Principio del test | 3 |
| 3. Contenuto della confezione | 3 |
| 3.1 Kit per 32 determinazioni | 3 |
| 3.2 Kit per 96 determinazioni | 3 |
| 4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi | 3 |
| 5. Precauzioni e avvertenze..... | 4 |
| 6. Altro materiale occorrente (non fornito)..... | 4 |
| 7. Materiale di analisi | 5 |
| 8. Esecuzione del test | 5 |
| 8.1 Preparazione dei campioni..... | 5 |
| 8.2 Preparazione dei reattivi | 5 |
| 8.3 Esecuzione del test di Immunoblot | 5 |
| 8.4 Impiego di processori Immunoblot | 6 |
| 9. Valutazione del test | 6 |
| 9.1 Valutazione dei campioni | 7 |
| 9.2 Impiego del controllo cut off | 7 |
| 9.3 Significato degli antigeni | 7 |
| 9.4 Criteri di valutazione..... | 8 |
| 9.5 Limiti del test | 9 |
| 10. Bibliografia..... | 9 |
| 11. Simboli..... | 10 |
| 12. Schema di svolgimento del test..... | 11 |

1. Finalità d'uso

Kit Line Immunoblot per l'individuazione qualitativa di anticorpi IgG e/o IgM specifici del virus di Epstein-Barr (EBV) nel siero umano. Il kit può essere utilizzato in una diagnosi estesa dell'EBV per la differenziazione e/o l'accertamento di sieronegatività, infezione primaria e infezione superata.

2. Principio del test

Le proteine dell'antigene patogeno vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa mediante una speciale tecnica a spruzzo. Tale membrana viene in seguito tagliata in singole strisce.

L'incubazione delle strisce di nitrocellulosa che supportano l'antigene assieme ai campioni di siero/plasma umano consente di individuare la presenza di anticorpi specifici. Tali anticorpi formano immunocomplessi con l'antigene fissato sulle strisce di prova. Dopo avere rimosso gli anticorpi non legati mediante opportune fasi di lavaggio, le singole strisce di nitrocellulosa vengono incubate con anticorpi IgG e/o IgM anti-umani coniugati a fosfatasi alcalina. Mediante un'ulteriore fase di lavaggio si rimuovono poi gli anticorpi coniugati non legati e si esegue la visualizzazione del complesso antigene/anticorpi (gli anticorpi legati), aggiungendo un substrato non colorato il quale, per reazione enzimatica propria, genera bande di colore violetto ("bande dell'antigene"). La reazione enzima/substrato viene arrestata lavando le strisce di nitrocellulosa in acqua distillata/deionizzata. A seconda del pattern delle bande osservato, si può rilevare la presenza di anticorpi specifici IgG e/o IgM.

3. Contenuto della confezione

3.1 Kit per 32 determinazioni

- | | | |
|---|-----------|------------|
| 1. Strisce di prova di IgG o IgM nitrocellulosa con antigeni a spruzzo, rinforzate con pellicola, assortite in bustina, pronte per l'uso | 1x | 32 strisce |
| 2. Controllo cut off IgM o IgG , siero umano, prediluito | 1x | 0,5 ml |
| 3. Tampone di lavaggio e di diluizione , pH 7,3 (10x cons.), con sostanze conservanti e Tris | 2x | 50 ml |
| 4. Coniugato IgG o IgM (100x conc.) anti-umano, fosfatasi alcalina (capra), con conservante | 1x | 0,7 ml |
| 5. Substrato (BCIP/NBT), pronto per l'uso | 1x | 57 ml |
| 6. Scheda protocollo d'analisi per protocollare e archiviare i risultati | 1x | 1 pz. |

3.2 Kit per 96 determinazioni

- | | | |
|---|-----------|------------|
| 1. Strisce di prova di IgG o IgM nitrocellulosa con antigeni a spruzzo, rinforzate con pellicola, assortite in bustina, pronte per l'uso | 3x | 32 strisce |
| 2. Controllo cut off IgM o IgG , siero umano, prediluito | 2x | 0,5 ml |
| 3. Tampone di lavaggio e di diluizione , pH 7,3 (10x cons.), con sostanze conservanti e Tris | 4x | 50 ml |
| 4. Coniugato IgG o IgM (100x conc.) anti-umano, fosfatasi alcalina (capra), con conservante | 3x | 0,7 ml |
| 5. Substrato (BCIP/NBT), pronto per l'uso | 3x | 57 ml |
| 6. Scheda protocollo d'analisi per protocollare e archiviare i risultati | 3x | 1 pz. |

Su richiesta sono disponibili anche:

IgG o IgM- Controllo positivo, siero umano, prediluito, 0,5 ml.

Per le bande positive \geq banda cut off si rimanda al certificato fornito a corredo.

(Art. n°: IgG: WE102P60 o IgM: WE102P80)

IgG/IgM- Controllo negativo, siero umano, prediluito, 0,5 ml.

Il controllo negativo non presenta nessuna banda, né bande rilevanti per la valutazione \geq banda cut off.

(Art. n°: IgG/IgM: WE102N10)

4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi

Conservare il kit a 2-8 °C. La scadenza dei singoli componenti è riportata sulle rispettive etichette; per la stabilità del kit vedere il certificato del controllo qualità.

1. Non esporre i singoli reattivi a temperature eccessivamente basse o elevate.
2. Non utilizzare i reattivi oltre la data di scadenza.
3. Non conservare i reattivi in ambiente con luce abbagliante.
4. La soluzione per substrato BCIP/ NBT è fotosensibile e va conservata al buio.
5. **Strisce di reazione in nitrocellulosa:** utilizzare immediatamente le strisce dopo averle estratte dalla scatola. Chiudere perfettamente le scatole contenenti strisce non utilizzate e conservare a 2-8°C. Per l'archiviazione dei risultati, si raccomanda di proteggere le strisce di reazione in nitrocellulosa dalla luce diretta del sole, in modo da evitare lo scolorimento delle bande.

| Materiale | Stato | Conservazione | Stabilità |
|------------------------|--------------------------------------|---|------------------|
| Campioni da analizzare | non diluiti | da +2 a +8°C | 1 settimana |
| Strisce di reazione | dopo l'apertura | da +2 a +8°C (conservazione nella busta in dotazione) | 3 mesi |
| Controlli | dopo l'apertura | da +2 a +8°C | 3 mesi |
| Coniugato | dopo l'apertura | da +2 a +8°C | 3 mesi |
| | diluito | da +2 a +8°C | circa 6 ore |
| Substrato | dopo l'apertura | da +2 a +8°C (protetto dalla luce) | 3 mesi |
| Soluzione per lavaggio | dopo l'apertura | da +2 a +8°C (protetto dalla luce) | 3 mesi |
| | diluizione finale (pronta per l'uso) | da +2 a +8°C | 4 settimane |
| | diluizione finale (pronta per l'uso) | <i>oppure</i> temperatura ambiente | 2 settimane |

5. Precauzioni e avvertenze

1. Come sieri di controllo si impiegano esclusivamente sieri testati e riscontrati negativi per anticorpi anti HIV1, HIV2, HCV ed agli antigeni di superficie dell'epatite B. Tuttavia i sieri di controllo, i campioni, i campioni diluiti, i coniugati e le strisce di reazione in nitrocellulosa devono essere sempre considerati materiali potenzialmente infetti e quindi manipolati con le precauzioni del caso. Applicare le direttive valide per il laboratorio.
2. Durante l'esecuzione dell'Immunoblot indossare guanti monouso e utilizzare pinzette di plastica.
3. Per lo smaltimento dei materiali utilizzati, attenersi alle direttive locali vigenti.
4. Le vasche di incubazione sono state concepite dal produttore come prodotti monouso. L'uso ripetuto di tali vasche ricade sotto la responsabilità dell'utilizzatore. In caso di uso ripetuto, raccomandiamo di disinfettare le vasche di incubazione per parecchie ore utilizzando soluzione di ipoclorito di sodio all'1%, pulendo e risciacquando a fondo con acqua corrente e acqua distillata/deionizzata.

6. Altro materiale occorrente (non fornito)

1. Vasca di incubazione (se necessario disponibile come art. n° WE300.08)
2. Agitatore (verticale non centrifugo)
3. Un flacone spruzzatore per bloccare la reazione
4. Pipetta o lavatore manuale
5. Micropipette da 5 µl - 1500 µl
6. Puntali pipettatori
7. Tubetti per campioni, volumi 2-20 ml
8. Pinzetta di plastica
9. Acqua distillata o deionizzata
10. Carta filtrante

7. Materiale di analisi

Come materiale di analisi è possibile utilizzare sia siero che plasma (in questo caso il tipo di anticoagulanti non ha alcuna rilevanza), anche se nel presente foglietto illustrativo è menzionato soltanto il siero. Per l'impiego di liquor, consultare le istruzioni per l'uso separate del test Liquor LINE.

8. Esecuzione del test

Il rigoroso rispetto del metodo indicato da Sekisui Virotech è la premessa indispensabile per conseguire risultati corretti.

8.1 Preparazione dei campioni

1. Per ogni campione prelevato dai pazienti sono necessari 15 µl di siero o di plasma. Nell'**elaborazione di liquor/siero**, utilizzare soltanto la diluizione di liquor/siero separata, calcolata singolarmente, per ogni classe di Ig (v. Istruzioni per il test Liquor LINE).
2. Si raccomanda di eseguire il prelievo venoso in condizioni asettiche. Separare il siero quando la coagulazione è completa (non presente per il plasma). Per una conservazione più prolungata, il siero deve essere congelato a - 20 °C.
3. Evitare di scongelare e ricongelare ripetutamente i sieri.
4. I sieri inattivati al calore, lipemici, emolitici o contaminati da batteri possono dare origine a risultati falsati e se ne sconsiglia pertanto il riutilizzo.
5. Non impiegare campioni di siero torbidi (specialmente dopo scongelamento), eventualmente centrifugarli (5 min. a 1000x g), quindi utilizzare per il test il surnatante limpido.

8.2 Preparazione dei reattivi

1. Per l'adattamento alla routine di laboratorio, è possibile elaborare tutti i LINE e gli EcoBlot in un unico ciclo di prova con gli stessi tempi di incubazione e componenti con una vasta gamma di parametri e lotti. I controlli cut off saranno predisposti in modo specifico ai parametri e ai lotti.
2. Prima di diluire i reattivi di prova, portare i concentrati a temperatura ambiente. Utilizzare esclusivamente acqua distillata/deionizzata di alta qualità e a temperatura ambiente.
3. Mescolare accuratamente le diluizioni prima di eseguire il test.
4. **Tampone di diluizione / lavaggio**
Il tampone di lavaggio e di diluizione è concentrato 10 volte. Diluire il concentrato del tampone di lavaggio e di diluizione 1:10 con acqua distillata o deionizzata (concentrato 10ml/50ml/100ml + 90ml/450ml/900ml acqua dist./deionizzata) e miscelare bene.
Sia i tamponi di diluizione/di lavaggio concentrati che quelli diluiti possono a volte presentare una colorazione giallastra. Tale fenomeno non ha alcun effetto né sulla durata del tampone, né sulla funzionalità e sull'attendibilità diagnostica della serie di test.
5. **Coniugato IgG e/o IgM**
Diluire il coniugato 1 + 100 con tampone di diluizione/lavaggio a diluizione finale, mescolare accuratamente. Per ciascun campione di siero si richiedono 1,5 ml di soluzione d'uso di coniugato. Vedere la tabella di diluizione del coniugato (punto: "Schema del test").
6. **Soluzione per substrato**
La soluzione per substrato viene fornita pronta per l'uso.

8.3 Esecuzione del test di Immunoblot

Attenzione: Le strisce di nitrocellulosa possono essere testate esclusivamente nella classe Ig idonea (vedere l'etichetta sulla bustina del blot e la descrizione su ciascuna singola striscia di prova).

Per l'esecuzione e la valutazione corrette degli LINE per la EBV, utilizzare anche un controllo cut off per ogni serie di test.

Al fine di formulare una diagnosi certa di EBV, si raccomanda di eseguire il test LINE nelle IgG e IgM.

1. Il test va eseguito a temperatura ambiente.
2. Inserire 1 striscia per ciascun campione nell'apposita scanalatura di una vasca d'incubazione pulita. Se possibile, afferrare le strisce solo dall'estremità superiore contrassegnata.
3. Dispensare su ciascuna striscia 1,5ml di **tampone di diluizione / lavaggio** pronto per l'uso e inserire nell'agitatore. Fare attenzione che le strisce di prova in nitrocellulosa siano coperte dal liquido in modo uniforme e che non si asciughino per l'intera durata di esecuzione del test.
4. Le strisce di prova rinforzate in nitrocellulosa vanno inumidite completamente entro un minuto e possono essere incubate in posizione rovesciata verso l'alto, capovolta o di lato.
5. Aggiungere su ogni striscia **15 µl di siero/plasma del paziente** o **100 µl del controllo cut off / positivo / negativo**, se possibile sull'estremità superiore contrassegnata. Incubare il siero del paziente e il controllo per **30 minuti** sull'agitatore. Durante la dispensazione e il successivo versamento, fare attenzione a evitare contaminazioni crociate tra i singoli campioni.
6. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare scolare con precauzione. Mentre si fa defluire il liquido, le strisce di prova in nitrocellulosa rimangono attaccate al bordo delle scanalature. Asciugare con carta assorbente il liquido residuo.
7. **Lavaggio** delle strisce: incubare ogni striscia con 1,5 ml di tampone di diluizione/lavaggio pronto per l'uso per **3 x 5 minuti** sull'agitatore. Aspirare sempre completamente il tampone di lavaggio o farlo scolare. Prima di procedere con l'ultima fase di lavaggio, preparare la necessaria quantità di diluizione fresca di coniugato (v. tabella).
7. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire (v. punto 6).
8. Dispensare 1,5 ml della **diluizione di coniugato** preparata in ciascuno dei corrispondenti solchi di incubazione e incubare per **30 minuti** sull'agitatore.
9. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire.
10. **Lavaggio** delle strisce: incubare ogni striscia con 1,5 ml di tampone di diluizione/lavaggio pronto per l'uso per **3 x 5 minuti** sull'agitatore. Aspirare sempre completamente il tampone di lavaggio o farlo scolare. Successivamente sciacquare per **1 x 1 minuti** con **acqua distillata/deionizzata**.
11. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire (v. punto 6).
12. Dispensare 1,5 ml di **soluzione per substrato** pronta per l'uso in ciascun solco e sviluppare sull'agitatore per **10 ± 3 minuti**.
13. **Arrestare** lo sviluppo cromatico facendo defluire la soluzione per substrato. Successivamente sciacquare le strisce per **3 volte** senza incubazione intermedia, utilizzando 1,5 ml di **acqua distillata/deionizzata** per ciascuna.
14. Fare scolare l'acqua distillata/deionizzata e lasciare asciugare le strisce su una carta assorbente pulita. La colorazione di fondo, osservabile sulle strisce di prova in nitrocellulosa umide, scompare completamente sulle strisce asciutte. Rispetto alle strisce di prova in nitrocellulosa tradizionali, quelle rinforzate richiedono un tempo leggermente più lungo per asciugarsi.
15. Per la valutazione, utilizzare il relativo protocollo allegato. La dicitura delle bande altamente specifiche riportata sulla scheda di protocollo facilita la valutazione dei campioni dei pazienti.

Vedere lo schema del test sull'ultima pagina

8.4 Impiego di processori Immunoblot

Per l'elaborazione automatica dei Blot e dei LINE, sono stati convalidati i seguenti apparecchi: Apollo e Profiblot. In linea di principio, sono idonei tutti i dispositivi automatici per Blot disponibili in commercio.

9. Valutazione del test

Per una valutazione sicura, ciascuna striscia LINE è provvista di due controlli:

1. **Controllo del siero** (= serum control):
La banda di incubazione del siero compare sotto la linea di marcatura (= markline) soltanto dopo l'incubazione con il siero del paziente.
2. **Controllo coniugato** (= conjugate control):
La strip LINE è dotata di una banda di controllo del coniugato che compare dopo l'incubazione con il coniugato corrispondente.

L'esecuzione del test è valida se sulle strisce di prova in nitrocellulosa sviluppate è chiaramente riconoscibile non solo il controllo del siero ma anche il controllo del coniugato interno.

Per la posizione della banda del controllo del siero/coniugato si rimanda alla scheda di protocollo.

9.1 Valutazione dei campioni

Per la posizione e la descrizione delle bande reattive si rimanda alla scheda di protocollo.

Bande delle IgM: gp125, p18, EA-D

Bande delle IgG: EBNA1, gp125, p18, EA-D

9.2 Impiego del controllo cut off

Le bande di intensità inferiore alla banda cut off del controllo cut off non vengono incluse nella valutazione.

Bande cut off delle IgG: 1. **p18** per la valutazione: della banda gp125, p18 e EA-D
della banda EBNA1, in caso di sierologia IgM pos.

2. **EBNA1** per la valutazione: della banda EBNA1, in caso di sierologia IgM neg.

Banda cut off delle IgM: **p18** per la valutazione: della banda gp125, p18 e EA-D

9.3 Significato degli antigeni

Elenco dei peptidi antigenici utilizzati (EBNA1, p18, EA-D) nonché dell'antigene gp125 purificato per affinità del virus di Epstein-Barr.

| Denominazione antigene | Significato degli antigeni | Specificità degli anticorpi nel test LINE |
|------------------------|---|--|
| EBNA1 | Epstein-Barr Nuclear Antigen (antigene nucleare di Epstein-Barr), proteina virale espressa nel nucleo di cellule con infezione latente. Gli anticorpi IgG anti-EBNA1 sono ritenuti marker sicuri di un'infezione da EBV superata. In rari casi eccezionali, può mancare la risposta immunitaria IgG all'EBNA1 (<i>primaria o secondaria</i>). In caso di pazienti immunosoppressi, gli anticorpi IgG anti-EBNA1 possono ridursi in misura considerevole (perdita di EBNA1 secondaria). | IgG: marcatore centrale altamente specifico per un'infezione da EBV <u>superata</u> IgM: significato non sufficientemente compreso |
| VCA-gp125 | Sono stati descritti diversi " Virus Capsid Antigen " (antigene capsidico virale). Come antigeni immunodominanti si considerano tra l'altro le proteine gp125 e p18. Gli anticorpi IgM anti-VCA-gp125/p18 scompaiono di norma alcune settimane dopo l'infezione, mentre gli anticorpi IgG anti-VCA-gp125/p18 persistono per tutta la vita. In caso di riattivazione, vengono sintetizzati occasionalmente nuovi anticorpi IgM anti-VCA-gp125/p18. | IgG-gp125: marker generale altamente specifico per infezioni da EBV IgM: altamente specifiche per un' <u>infezione primaria</u> da EBV |
| VCA-p18 | Si vedano anche le spiegazioni relative al punto "VCA-gp125". Nella sierologia delle IgM il peptide p18 è un marker altamente specifico per infezioni primarie. Nelle infezioni primarie si riscontra di norma in primo luogo una marcata risposta degli anticorpi IgM anti-p18, seguita da un aumento degli anticorpi IgG anti-p18. Questo aumento delle IgG raggiunge il valore massimo quando i titoli di IgM si riducono e prima che intervenga una risposta immunitaria IgG all'EBNA1. | IgG-p18: marker altamente specifico per il contatto con EBV in stadio avanzato IgM: altamente specifiche per un' <u>infezione primaria</u> da EBV |
| EA-D | " Early Antigen-Diffuse " (antigene precoce diffuso) fa parte degli antigeni precoci sintetizzati nel ciclo replicativo virale (fase infettiva attiva). Gli | IgG: 1.) specifiche per <u>infezioni</u> |

| | | |
|--|--|--|
| | anticorpi IgG e IgM anti-EA-D si riscontrano tipicamente nelle infezioni primarie, contemporaneamente in presenza di IgG anti-EBNA negative. Durante la convalescenza gli anticorpi IgG anti-EA-D si riducono ma, in caso di riattivazione dell'EBV, possono aumentare di nuovo in misura consistente. Tale incremento degli anticorpi non consente tuttavia di formulare alcuna diagnosi sulla rilevanza clinica di una riattivazione dell'EBV. | <u>primarie</u> da EBV 2.) marcatore sierologico per una riattivazione dell'EBV IgM: specifiche per <u>infezioni primarie</u> da EBV |
|--|--|--|

9.4 Criteri di valutazione

L'interpretazione dei risultati sierologici deve sempre tenere conto del quadro clinico, dei dati epidemiologici e dei risultati di altri esami di laboratorio disponibili.

Valutazione raccomandata delle IgG

| Banda/e | Risultato | Valutazione |
|---|--|---|
| Nessuna banda <u>oppure</u> Banda/e < banda cut off | negativo | Nessun anticorpo IgG individuabile contro gli antigeni EBV. |
| EBNA1 1.) <u>in caso di sierologia delle IgM neg.:</u> ≥ banda cut off dell'EBNA1 2.) <u>in caso di sierologia delle IgM pos.:</u> ≥ banda cut off del p18 | positivo | L'individuazione di anticorpi IgG anti-EBNA1 funge da marker sierologico centrale per un'infezione da EBV superata, che esclude un'infezione primaria. In mancanza di una risposta degli anticorpi IgG anti-EBNA1 ("soggetti non rispondenti" a EBNA1) nonché in mancanza di indizi della presenza di un'infezione primaria nella sierologia delle IgM, un riscontro positivo del p18 è indicativo di un'infezione da EBV superata. |
| gp125 ≥ banda cut off (p18) | positivo | In linea generale gli anticorpi IgG anti-gp125 sono indicativi di un'infezione da EBV e persistono per tutta la vita dopo la risoluzione di un'infezione da EBV. Non è possibile differenziare fra infezione primaria e infezione da EBV superata sulla base degli anticorpi IgG anti-gp125. |
| p18 ≥ banda cut off (p18) | positivo | Dopo la risoluzione di un'infezione da EBV gli anticorpi IgG anti-p18 persistono di norma per tutta la vita. In mancanza di una risposta degli anticorpi IgG anti-EBNA1 ("soggetti non rispondenti" a EBNA1) nonché in mancanza di indizi della presenza di un'infezione primaria nella sierologia delle IgM, un riscontro positivo del p18 è indicativo di un'infezione da EBV superata. |
| EA-D ≥ banda cut off (p18) | positivo | Gli anticorpi IgG anti-EA-D si riscontrano regolarmente nei pazienti con infezione primaria da EBV circa 8-10 giorni dopo l'inizio dei sintomi clinici e, poi, entro qualche settimana, si riducono normalmente di nuovo al di sotto del limite d'individuazione. In caso di riattivazione dell'EBV possono formarsi anche anticorpi IgG anti-EA-D. Tale incremento degli anticorpi non consente tuttavia di formulare alcuna diagnosi sulla rilevanza clinica di una riattivazione dell'EBV. |
| Tutte le bande (in casi eccezionali: perdita di anti-EBNA1) | positivo elevate intensità di banda | È possibile una riattivazione sierologica. Spesso il riscontro sierologico "Riattivazione dell'EBV" non permette di formulare alcuna diagnosi sulla rilevanza clinica di una riattivazione dell'EBV. In caso di dubbio si raccomanda di eseguire ulteriori indagini mediante PCR. |

Valutazione raccomandata delle IgM

| Banda/e | Risultato | Valutazione |
|---|-----------|---|
| Nessuna banda oppure Banda/e < banda cut off | negativo | Nessun anticorpo IgM individuabile contro gli antigeni EBV. |
| gp125 ≥ banda cut off (p18) | positivo | Indicazione di <u>infezione primaria</u> , soprattutto in mancanza di una risposta immunitaria IgG all'EBNA1 (vedere anche valutazione delle IgG per l'EBNA1) |
| p18 ≥ banda cut off (p18) | positivo | Indicazione di <u>infezione primaria</u> , soprattutto in mancanza di una risposta immunitaria IgG all'EBNA1 (vedere anche valutazione delle IgG per l'EBNA1) |
| EA-D isolati reattivi ≥ banda cut off (p18) | negativo | Gli anticorpi IgM anti-EA-D vengono sintetizzati di <u>frequente nelle infezioni primarie</u> , ma si riscontrano sempre in combinazione con gli anticorpi IgM anti-p18 e/o anti-gp125, pertanto non vengono inclusi nella valutazione. |

9.5 Limiti del test

1. Un risultato negativo del blot non esclude completamente la possibilità di un'infezione da EBV.
2. In rari casi i sieri dei pazienti possono presentare bande "inverse" (fondo scuro, bande bianche); non eseguire la valutazione di queste bande, poiché in questi casi l'immunoblot non è valutabile. Si raccomanda di controllare il siero con altri opportuni metodi sierologici.
3. La sierologia dell'EBV da sola non permette di formulare alcuna diagnosi sulla rilevanza clinica di una riattivazione (9).
4. Un risultato negativo degli anticorpi anti-EBNA1 non è necessariamente indicativo di infezione primaria. In caso di pazienti immunosoppressi può verificarsi una perdita di anti-EBNA1 secondaria e nel 5% dei pazienti infettati da EBV (soggetti non rispondenti a EBNA1) non si formano anticorpi anti-EBNA1 (8, 10).
5. Un riscontro negativo delle IgM anti-VCA non esclude la possibilità di un'infezione primaria, poiché in alcuni casi di infezione acuta non si formano IgM anti-VCA (soggetti non rispondenti alle IgM) (8, 10).
6. Il risultato della sierologia dell'EBV può risentire degli effetti di anticorpi trasportati passivamente poco prima dell'analisi. Ciò accade, ad esempio, in caso di trasfusioni di sangue o di anticorpi materni trasmessi al lattante.

10. Bibliografia

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. Leikola. (1974). IgM antibodies specific for EBV in IM without heterophile agglutination test. Br. Med. J. 4:72-75.
3. Klemola, E., R. von Essen, G. Henle and W. Henle. (1970). IM-like disease with negative heterophile agglutination test. J. Infect. Dis. 121:608-614.
4. Sumaya, C.V. and Y. Ench. (1985). EBV mononucleosis in children. Il paediatrics. 75:1011-1019.
5. Schmitz, H., D. Volz, C.H. Krainlek-Richert and M. Schere. (1972). Acute EBV infections in Children. Med. Microbiol. Immunol. 158:58-63.
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. Micro. 30(6):1442-1448.
7. Lennette, E.T. and W. Henle. (1987). Epstein-Barr virus infections: clinical and serological features. Lab. Manage. 25:23-28.
8. Bauer, G. (1995). Rationale und rationelle Epstein-Barr-Virus-Diagnostik. Clin. Lab. 41: 623-634.
9. Gärtner et al. (2000). No correlation in Epstein-Barr virus reactivation between serological parameters and viral load. JCM 38 (6): 2458
10. Bauer, G. (2001). Simplicity through complexity: immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein-Barr virus serology. Clin. Lab. 47:223-230.
11. Modrow, S. und D. Falke (2010). Das Epstein-Barr Virus. S. 572-577. In: Molekulare Virologie, Spektrum Verlag, ISBN: 978-3-8274-1833-3.

11. Simboli



Vedere le Istruzioni per l'Uso

12. Schema di svolgimento del test

Esecuzione del test in breve:

| | | |
|-----------------------|--|--|
| Preincubazione | 30 minuti | 15 µl di siero/plasma del paziente / 100 µl di controllo in 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio |
| Lavaggio | 3 x 5 minuti | Con 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio |
| Incubazione coniugato | 30 minuti | Con 1,5 ml di diluizione d'uso (1 + 100) |
| Lavaggio | 3 x 5 minuti 1 x 1 minuto | Con 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio Con acqua distillata/deionizzata |
| Incubazione substrato | 10 ± 3 minuti | Con 1,5 ml per campione di soluzione per substrato |
| Arresto | 3 x senza incubazione intermedia | Con 1,5 ml per campione di acqua distillata/deionizzata. |

Tabella di diluizione coniugato: (valori arrotondati)

| Numero strisce | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------------------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|
| Tampone di diluizione/lavaggio | 1,5ml | 3,0ml | 4,5ml | 6,0ml | 7,5ml | 9,0ml | 11,0ml | 12,0ml | 14,0ml | 15,0ml |
| coniugato Concentrato | 15µl | 30µl | 45µl | 60µl | 75µl | 90µl | 110µl | 120µl | 140µl | 150µl |
| Volumi finali | 1,515ml | 3,03ml | 4,545ml | 6,06ml | 7,575ml | 9,09ml | 11,11ml | 12,12ml | 14,14ml | 15,15ml |

| Numero strisce | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|--------------------------------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| Tampone di diluizione/lavaggio | 17,0ml | 18,0ml | 20,0ml | 21,0ml | 23,0ml | 24,0ml | 26,0ml | 27,0ml | 29,0ml | 30,0ml |
| coniugato Concentrato | 170µl | 180µl | 200µl | 210µl | 230µl | 240µl | 260µl | 270µl | 290µl | 300µl |
| Volumi finali | 17,17ml | 18,18ml | 20,2ml | 21,21ml | 23,23ml | 24,24ml | 26,26ml | 27,27ml | 29,29ml | 30,3ml |

| Numero strisce | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
|--------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Tampone di diluizione/lavaggio | 32,0ml | 33,0ml | 35,0ml | 36,0ml | 38,0ml | 39,0ml | 41,0ml | 42,0ml | 44,0ml | 45,0ml |
| coniugato Concentrato | 320µl | 330µl | 350µl | 360µl | 380µl | 390µl | 410µl | 420µl | 440µl | 450µl |
| Volumi finali | 32,32ml | 33,33ml | 35,35ml | 36,36ml | 38,38ml | 39,39ml | 41,41ml | 42,42ml | 44,44ml | 45,45ml |

| Numero strisce | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
|--------------------------------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| Tampone di diluizione/lavaggio | 47,0ml | 48,0ml | 50,0ml | 51,0ml | 53,0ml | 54,0ml | 56,0ml | 57,0ml | 59,0ml | 60,0ml |
| coniugato Concentrato | 470µl | 480µl | 500µl | 510µl | 530µl | 540µl | 560µl | 570µl | 590µl | 600µl |
| Volumi finali | 47,47ml | 48,48ml | 50,5ml | 51,51ml | 53,53ml | 54,54ml | 56,56ml | 57,57ml | 59,59ml | 60,6ml |