



EBV IgM / IgG BLOT 3.0 DOSAGGIO WESTERN BLOT



DATA DI REVISIONE: 03/06
MAN 0011-ITA-1

Nota: modifiché evidenziate

REF (18 kit per test) : 11350-018
(36 kit per test) : 11350-036

NOME E USO PREVISTO

Il kit **EBV IgM/IgG Blot 3.0 di MP Diagnostics (MPD)** è un dosaggio qualitativo immunoenzimatico per il rilevamento *in vitro* degli anticorpi IgG e IgM contro il virus di Epstein Barr (EBV) nel siero o nel plasma umano. Il test rappresenta un test sierologico per il rilevamento di infezioni da EBV. Eseguendo il dosaggio per anticorpi specifici IgG e IgM anti-EBV, è possibile ricavare la sierodiagnosi dell'infezione da EBV.

INTRODUZIONE

Il virus di Epstein Barr (EBV) è un patogeno umano ubiquitario che fa parte della famiglia dell'herpes virus. In tutto il mondo circa il 90% della popolazione adulta contrae il virus EBV. Dopo l'infezione primaria, il virus rimane a vita nell'organismo ospite in uno stato di latenza che può riattivarsi passando ad uno stato di immunodepressione come nei malati di HIV e pazienti con trapianto d'organi. L'infezione primaria da EBV può essere asintomatica o portare ad una malattia linfoproliferativa autolitante nota come mononucleosi infettiva (MI).^{1,2} I sintomi clinici della MI possono comprendere tonsillofaringite, febbre alta, linfadenopatia cervicale e malessere. L'EBV è associato anche a tumori maligni quali il carcinoma rinofaringeo e il linfoma di Burkitt.³

Per la diagnosi dell'infezione primaria e secondaria da EBV, è necessario eseguire test per la misurazione degli anticorpi EBV specifici. Per la sierodiagnosi dell'EBV, la tecnica più utilizzata è quella del test ad immunofluorescenza indiretta (IFA) oltre al test per gli anticorpi eterologhi associati alla MI. Per migliorare la specificità del rilevamento degli anticorpi anti-EBV i test ELISA sono stati recentemente integrati con antigeni EBV ricombinanti. La reattività a diverse classi di antigeni getta una nuova luce su vari profili sierologici dell'infezione da EBV.

Il kit **EBV IgM/IgG Blot 3.0 di MP Diagnostics** consente di determinare sia gli anticorpi IgG che IgM per specifici antigeni ricombinanti codificati per l'EBV. Gli antigeni ricombinanti sono:

1. Antigene del capside virale (VCA) : p23 (BLRF2)^{3,4}
2. Antigene precoce [diffuso] (EA-D) : p54 (BMFR1)^{3,4,5,6}
3. Antigene precoce (EA) : p138 (BALF2)³
4. Antigene nucleare (EBNA-1) : p72 (BKRF1)^{3,4,5,6,7}

In generale, la presenza di anticorpi specifici IgM rispetto all'antigene p23 (VCA) è indice di infezione acuta da EBV. La presenza invece di anticorpi specifici anti-p72 (EBNA-1) con anticorpi IgM anti-VCA coesistenti è indice di infezione secondaria.

DESCRIZIONE DEI SIMBOLI UTILIZZATI

Sui prodotti **MP Diagnostics** e relative confezioni si possono trovare i simboli grafici riportati di seguito. Sono i simboli generalmente utilizzati per l'etichettatura dei dispositivi medici e dei relativi imballi. Per informazioni più dettagliate consultare la norma britannica ed europea BS EN 980: 2003.

Utilizzare entro
Sinonimi:
Data di scadenza

Dispositivo medico
diagnostico in vitro

Codice partita
Sinonimi:
Numero di lotto
Numero di partita

Numero di catalogo

Limitazione di temperatura

Attenzione.
Vedere le Istruzioni per l'uso

Produttore

Rappresentante autorizzato per la Comunità Europea

Contiene il necessario per l'esecuzione di <n> analisi

Vedere le Istruzioni per l'uso

Non riutilizzare

COMPONENTI DEL KIT

Descrizione dei componenti	Quantità fornita
STRISCE DI NITROCELLULOSA Contenenti quattro proteine ricombinanti dell'EBV e due bande per il controllo del siero	Disponibile in confezioni da 18 o 36 strisce

CONTROLLO REATTIVO (IgG) Siero umano inattivato con anticorpi IgG anti-EBV. Non reattivo per anti HCV, anti HIV-1/2 e HBsAg. Contiene sodio azide e thimerosal come conservanti.	1 provetta (80 µl)
--	--------------------

CONTROLLO NON REATTIVO (IgM) Siero umano normale inattivato negativo ad anticorpi IgM anti-EBV. Non reattivo per anti HCV, anti HIV-1/2 e HBsAg. Contiene sodio azide e thimerosal come conservanti.	1 provetta (80 µl)
--	--------------------

SOLUZIONE TAMPONE CONCENTRATA (10x) Tampone tris contenente siero di capra inattivato tramite calore. Contiene thimerosal come conservante.	1 fialone (20 ml)
---	-------------------

TAMPONE DI LAVAGGIO CONCENTRATO (20x) Tampone tris con Tween-20. Contiene thimerosal come conservante.	1 fialone (70 ml)
--	-------------------

CONIUGATO anti-IgG IgG anti-umane di capra coniugate con fosfatasi alcalina. Contiene sodio azide come conservante.	1 provetta (120 µl)
---	---------------------

CONIUGATO anti-IgM IgM anti-umane di capra coniugate con fosfatasi alcalina. Contiene sodio azide come conservante.	1 provetta (120 µl)
---	---------------------

SUBSTRATO Soluzione di 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e nitroblu di tetrazolo (NBT).	1 fialone (100 ml)
--	--------------------

REAGENTE PER LA RIMOZIONE DEL FATTORE REUMATOIDE, PREDILUITO (RFRR-D) Contiene sodio azide come conservante.	1 o 2 provette (1800 µl ciascuna)
POLVERE PER BLOT Latte scremato in polvere	10 confezioni (1 g ciascuna)
Vaschette per incubazione a 9 pozzetti	2 o 4 vassoi
Manuale di istruzioni	1 copia
Pinzette	1 paio

Nota: Il volume di reagente fornito è sufficiente per 4sedute.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Solo per uso diagnostico *in vitro*.
2. Solo per uso professionale.
3. Per informazioni sui componenti potenzialmente pericolosi leggere le etichette apposte sui prodotti.

NORME DI SICUREZZA

! **ATTENZIONE:** Questo kit contiene sostanze di origine umana. Nessun metodo di prova è in grado di garantire con assoluta certezza che i prodotti derivati dal sangue umano non trasmettano infezioni.

MANEGGIARE TUTTI I CAMPIONI D'ANALISI, NONCHÉ I CONTROLLI REATTIVI E NON REATTIVI, COME AGENTI POTENZIALMENTE INFETTIVI. Si consiglia di maneggiare i componenti e i campioni di analisi nel rispetto delle pratiche operative di laboratorio. Lo smaltimento del materiale dovrà essere effettuato in conformità alle procedure di sicurezza stabilite.

Il **controllo reattivo** e il **controllo non reattivo** contengono thimerosal e sodio azide e la soluzione tampone concentrata e il tampone di lavaggio contengono thimerosal, mentre il coniugato contiene sodio azide. Il sodio azide può reagire con il rame e il piombo utilizzati in alcuni impianti idraulici con la conseguente formazione di sali esplosivi. Sebbene le quantità utilizzate in questo kit siano limitate, si raccomanda comunque di smaltire sempre i materiali contenenti azide in abbondante acqua corrente onde evitare l'accumulo di metallo-azide nell'impianto idraulico. Qui di seguito sono elencate le frasi relative ai rischi (R) per il sodio azide.

R22 Nocivo per ingestione.

Il **substrato** contiene 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato e nitroblu di tetrazolo, classificato secondo le direttive della Comunità Economica Europea (CEE) come nocivo (Xn). Qui di seguito sono elencate le frasi relative ai rischi (R).

R20/21/22 Nocivo per inalazione, contatto con la pelle ed ingestione.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

1. TAMPONE DI LAVAGGIO DILUITO
(a) Il TAMPONE DI LAVAGGIO DILUITO deve essere preparato fresco prima dell'uso.
(b) Diluire un volume di TAMPONE DI LAVAGGIO CONCENTRATO (20x) in 19 volumi di acqua per reagenti. Mescolare accuratamente.

2. TAMPONE DI BLOTTING
(a) Il TAMPONE DI BLOTTING deve essere preparato fresco prima dell'uso.
(b) Diluire 1 volume di SOLUZIONE TAMPONE CONCENTRATA (10x) in 9 volumi di acqua per reagenti. Mescolare accuratamente.
(c) Aggiungere 1 g di POLVERE PER BLOT per 20 ml di SOLUZIONE TAMPONE CONCENTRATA preparata come indicato sopra, al punto 2(b). Agitare fino a sciogliere completamente la polvere.
(d) Agitare nuovamente prima di dispensare.

3. SOLUZIONE DI LAVORO DEL CONIUGATO
Nota: Preparare la soluzione in un recipiente o fiasco di polipropilene.
(a) La SOLUZIONE DI LAVORO DEL CONIUGATO deve essere preparata ogni volta prima dell'uso.
(b) Preparare la SOLUZIONE DI LAVORO DEL CONIUGATO diluendo il CONIUGATO 1:1000 nel TAMPONE DI BLOTTING, ad esempio, 5 µl di CONIUGATO in 5 ml di TAMPONE DI BLOTTING. Il fattore di diluizione di 1:1000 si applica al coniugato IgG che a quello IgM.

4. SOLUZIONE DI SUBSTRATO (pronta per l'uso)
(a) Dispensare il volume richiesto direttamente dal fialone. Utilizzare una pipetta pulita. Dopo l'uso chiudere accuratamente.

5. TRATTAMENTO DI PRE-ASSORBIMENTO DELL'IgG
Questo punto è soltanto per l'analisi di IgM soltanto. Trattare i campioni e il siero di controllo come segue:
(a) Aggiungere 180 µl di RFRR-D nella provetta microglughe.
(b) Aggiungere 20 µl di campione e miscelare accuratamente.
(c) Il campione è pronto per l'uso dopo un periodo di incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente.

PROCEDURA DEL TEST

Nota: a) Ogni campione di siero o plasma deve essere analizzato sia per la reattività delle IgM che delle IgG.
b) Aspirare tutte le sostanze chimiche e i reagenti residui in un contenitore con ipoclorito di sodio.
c) Ogni incubazione deve essere effettuata su un agitatore oscillante.

2

Attenzione:

Alcuni campioni provocano la formazione di macchie scure sulla striscia quando vengono aggiunti. Per evitare questo inconveniente, procedere come segue:

- i. Aggiungere il campione soltanto dopo aver aggiunto il TAMPONE DI BLOTTING.
- ii. Inclinare leggermente il vassoio sollevandolo dall'estremità superiore o inferiore. Il tampone di blotting dovrà fluire verso l'estremità inferiore del vassoio. Aggiungere il campione nel punto di raccolta del tampone di blotting. Una volta aggiunti tutti i campioni, riportare il vassoio in posizione orizzontale. Accertarsi che le strisce rimangano costantemente umide durante l'operazione.
- iii. In alternativa, se non si desidera inclinare il vassoio, i campioni possono essere aggiunti sull'estremità superiore o inferiore del pozzetto. In questo modo, anche in caso di comparsa di macchie scure, la lettura dei risultati della striscia non viene influenzata.

Procedimento:

1. Prendere con cautela il numero di STRISCE occorrenti dalla confezione usando le pinzette e sistemarle, con il lato numerato rivolto verso l'alto, una per pozzetto. Disporre 1 striscia per il dosaggio IgG per il controllo reattivo e 1 striscia per il dosaggio IgM per il controllo non reattivo.
2. Aggiungere 2 ml di SOLUZIONE DI LAVAGGIO DILUITA a ciascun pozzetto. **2 ml**
3. Incubare le strisce per almeno 5 minuti a temperatura ambiente (25 ± 3°C) su un agitatore oscillante (alla velocità di 12 - 16 oscillazioni al minuto). Eliminare la soluzione tampone mediante aspirazione. **5 minuti**
4. Aggiungere 2 ml di SOLUZIONE DI BLOTTING a ciascun pozzetto. **2 ml**
5. a) Per il dosaggio IgG, aggiungere 20 µl di siero del paziente o di controllo, a seconda del pozzetto. **20 µl**
b) Per il dosaggio IgM, aggiungere tutti i 200 µl di campione preassorbito di IgG a seconda del pozzetto. **200 µl**

Nota: non dimenticarsi di utilizzare il siero di controllo reattivo per il dosaggio IgG e il siero di controllo non reattivo per il dosaggio IgM.

1. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti durante l'apertura delle provette o dei fialoni originali e durante il prelievo dei materiali.
2. Non pipettare con la bocca.
3. Maneggiare i campioni di analisi, le strisce di nitrocellulosa, i controlli reattivi e non reattivi come agenti potenzialmente infettivi.
4. Indossare indumenti da laboratorio e guanti monouso durante l'esecuzione delle analisi. I guanti devono essere gettati negli appositi contenitori a rischio biologico. Lavarsi accuratamente le mani al termine dell'operazione.
5. Si raccomanda di eseguire il test in uno spazio apposito per procedure con rischio di contaminazione biologica.
6. Evitare il contatto dei materiali con cibi e bevande.
7. In caso di contatto con gli occhi sciacquare immediatamente con abbondante acqua e richiedere assistenza medica.
8. In caso di ingestione o di contatto dei materiali contaminati con ferite aperte o altre lacerazioni cutanee, consultare immediatamente il medico.
9. Asciugare immediatamente ogni versamento di materiale potenzialmente infettivo con carta assorbente e tamponare l'area contaminata con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% prima di riprendere il lavoro. In presenza di versamenti contenenti sostanze acide, asciugare l'area con carta assorbente prima di utilizzare l'ipoclorito di sodio. Tutto il materiale usato (inclusi i guanti monouso) dovrà essere smaltito come materiale a rischio biologico. Non autoclavare il materiale contenente ipoclorito di sodio.
10. Prima dell'eliminazione, sterilizzare in autoclave tutto il materiale utilizzato e contaminato a 121°C a 15 p.s.i. per 30 minuti. In alternativa, decontaminare i materiali in una soluzione di ipoclorito di sodio al 5% per 30-60 minuti prima di gettarli negli appositi contenitori a rischio biologico.
11. Decontaminare tutti i reagenti e le sostanze chimiche impiegate in una soluzione di ipoclorito di sodio con una concentrazione finale pari almeno all'1%. Lasciare agire per 30 minuti per garantire una efficace decontaminazione.
12. Si sconsiglia il riutilizzo delle vaschette per incubazione.

6. Coprire il vassoio con il relativo coperchio e incubare per 1 ora a temperatura ambiente (25 ± 3°C) sull'agitatore oscillante. **60 minuti**
7. Scoprire con cautela la vaschetta per evitare la fuoriuscita del materiale o il rimescolamento dei campioni. Inclinare la vaschetta per aspirare la miscela dai pozzetti. Tra un campione e l'altro, cambiare il beccuccio dell'aspiratore per evitare una contaminazione incrociata.
8. Lavare ogni striscia per 3 volte con 2 ml di TAMPONE DI LAVAGGIO DILUITO lasciandolo penetrare per 5 minuti sull'agitatore oscillante tra ogni lavaggio. **3 x 2 ml**

9. Aggiungere 2 ml di SOLUZIONE DI CONIUGATO a ogni pozzetto. **2 ml**
10. Coprire lavaschetta e incubare per 1 ora a temperatura ambiente (25 ± 3°C) sull'agitatore oscillante. **60 minuti**
11. Aspirare il CONIUGATO dai pozzetti. Eseguire un lavaggio come indicato al punto 8. **3 x 2 ml**
12. Aggiungere 2 ml di SOLUZIONE DI SUBSTRATO a ogni pozzetto. **2 ml**
13. Coprire la vaschetta e incubare per 15 minuti sull'agitatore oscillante. **15 minuti**
14. Aspirare il SUBSTRATO e sciacquare almeno tre volte le strisce con acqua per reagenti per arrestare la reazione. (In caso di lavaggio insufficiente, a questo punto può apparire uno sfondo scuro). **3 x 2 ml**
15. Prendere delicatamente le strisce con le pinzette e appoggiarle su fazzoletti di carta. Coprire con altri fazzoletti e asciugare. In alternativa, lasciare asciugare le strisce nei pozzetti della vaschetta.
16. Sistemare le strisce su carta da lavoro (carta bianca non assorbente). Non applicare scotch sulle bande che si sono formate. Osservare le bande (vedere Interpretazione dei risultati) e classificare i risultati. Conservare le strisce al buio.

PRECAUZIONI DI IMPIEGO

1. Per ottenere prestazioni ottimali dal test occorre **SEGUIRE RIGOROSAMENTE** le procedure illustrate nel presente Manuale di Istruzioni. Qualsiasi deviazione dalla procedura può provocare risultati erranei.
2. **NON MODIFICARE O SCAMBIARE REAGENTI DI KIT APPARTENENTI A LOTTI DIVERSI.** I controlli, il coniugato e le strisce di Western Blot sono stati abbinati per ottenere prestazioni ottimali. Utilizzare unicamente i reagenti forniti con il kit.
3. Non utilizzare i componenti del kit dopo la data di scadenza riportata sulla confezione.
4. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti nell'aprire le provette o i fialoni originali e prelevare i materiali poiché ne potrebbero derivare risultati erronei nonché la prematura riduzione della durata di conservazione del prodotto. Utilizzare tecniche asettiche, incluse pipette o punte di pipette monouso, per l'aspirazione dei materiali dai fialoni.
5. I controlli del kit devono essere analizzati contemporaneamente ai campioni dei pazienti per ogni ciclo di analisi.
6. Per evitare una contaminazione incrociata, cambiare la punta della pipetta tra un campione e l'altro.
7. Per ottenere migliori risultati, dispensare tutti i reagenti a freddo e riportarli ad una temperatura di 2°C - 8°C non appena possibile.
8. Tutto il materiale di vetro previsto per l'utilizzo con i reagenti dovrà essere lavato con acido cloridrico 2M e sciacquato abbondantemente con acqua distillata o deionizzata, prima dell'uso.
9. Utilizzare unicamente acqua ionizzata, distillata o comunque di qualità idonea per la diluizione dei reagenti.
10. Tutti i reagenti dovranno essere miscelati accuratamente prima dell'uso.
11. La soluzione di lavoro del coniugato, il tampone di lavaggio diluito e il tampone di blotting devono essere **preparati ogni volta prima dell'uso.**
12. La soluzione di lavoro del coniugato deve essere preparata utilizzando un recipiente o un contenitore graduato in polipropilene.

SOMMARIO PROTOCOLLI DI ANALISI			
Reagenti	Quantità	Durata	
Striscia nitrocellulosa	1	-	
Tampone lavaggio	2 ml	5 min.	
Tampone di blotting	2 ml	-	
Camione (Dosaggio IgG)	20 µl	60 min.	
Camione (Dosaggio IgM)	200 µl	60 min.	
Tampone lavaggio	3 x 2 ml	3 x 5 min.	
Coniugato	2 ml	60 min.	
Tampone lavaggio	3 x 2 ml	3 x 5 min.	
Substrato (pronto per l'uso)	2 ml	15 min.	
Acqua distillata	3 x 2 ml	-	

QUANTITÀ NECESSARIA DI REAGENTI PER NUMERO DI STRISCE							
REAGENTI	NUMERO DI STRISCE DA UTILIZZARE						
	6	10	14	18	24	30	36
1X Tampone di lavaggio (ml)	100	160	220	280	360	440	520
1X Tampone di blotting (ml)	40	60	80	80	120	140	160
Coniugato anti-IgM (µl)	9	13	17	21	27	33	39
Coniugato anti-IgG (µl)	9	13	17	21	27	33	39
Substrato (ml)	17	25	33	41	53	65	77
Polvere per blot (g)	2	3	4	4	6	7	8

CONTROLLO QUALITÀ

Per ogni dosaggio **IgG**, utilizzare **solo** il controllo reattivo.

CONTROLLO REATTIVO (IgG)
Devono essere presenti entrambe le bande di controllo del siero (anti-IgG e anti-IgM). La banda di controllo anti-IgG avrà +/- intensità. Devono essere presenti tutte e quattro le bande delle proteine ricombinanti dell'EBV (la p138 potrebbe avere una +/- intensità.)

Per ogni dosaggio **IgM**, utilizzare **solo** il controllo non reattivo.

CONTROLLO NON REATTIVO (IgM)
È presente solo la banda di controllo del siero anti-IgM. Tuttavia, è possibile che sia presente anche la banda di controllo del siero anti-IgG (+/- intensità) a causa della reattività crociata del coniugato.

1

13. Evitare di esporre i reagenti o di eseguire i test in un ambiente contenente un grado elevato di vapori di disinfettanti chimici (es. vapori di ipoclorito) durante le fasi di conservazione e incubazione. Il contatto infonde la reazione cromatica. Non esporre i reagenti ad eccessiva luminosità.
14. L'analisi deve essere effettuata preferibilmente a temperatura ambiente (25 ± 3°C).
15. Sistemare le strisce con il lato numerato rivolto verso l'alto.
16. È necessario utilizzare un agitatore a piattaforma oscillante anziché un agitatore rotante. In caso contrario, le prestazioni del kit potrebbero essere pregiudicate. Si raccomanda di azionare l'agitatore ad una velocità di 12 - 16 cicli al minuto, con un angolo di inclinazione di 5 - 10 gradi.
17. In caso di impiego di strumentazione automatica, accertarsi che questa sia validata prima dell'uso.
18. Accertarsi che i campioni vengano aggiunti dalla striscia. Il vassoio può essere inclinato e il campione aggiunto quando il tampone viene raccolto all'estremità inferiore. In questo modo si impedisce la formazione di macchie scure dovute all'aggiunta del campione sulla striscia.
19. Evitare l'impiego di congelatori a sbrinamento automatico per la conservazione di reagenti e campioni.

ISTRUZIONI PER LA CONSERVAZIONE

1. Conservare il kit EBV IgM/IgG BLOT 3.0 di MPD e i relativi componenti a 2°C - 8°C quando non sono utilizzati.
 2. Se conservati alla temperatura di 2°C - 8°C, tutti i reagenti e le strisce per il test mantengono la stabilità fino alla data di scadenza riportata sul kit. Non congelare i reagenti.
- A. **Strisce**
- Evitare inutili esposizioni delle strisce alla luce.
- B. **Reagenti**
- Conservare i reagenti nelle provette o nei fialoni originali con i cappucci correttamente serrati.
 - Dispensare tutti i reagenti a freddo e riportarli ad una temperatura di 2°C - 8°C non appena possibile.
 - La conservazione del substrato a 2°C - 8°C può provocare la formazione di precipitato. Questo, tuttavia, non avrà alcuna influenza sulle prestazioni del kit.
 - Attendere che tutti i reagenti del kit raggiungano la temperatura ambiente prima di utilizzarli (circa 30 minuti).

ATTENZIONE: Evitare l'esposizione non strettamente necessaria del substrato alla luce.

4

5

3

6

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Sistemare le strisce e registrare l'ID paziente, il numero del campione, la diagnosi clinica e altre informazioni pertinenti.

Gli antigeni ricombinanti sono i seguenti:

1. Antigene del capsid virale - p23 (BLRF2)
2. Antigene precoce (diffuso) - p54 (BMRF1)
3. Antigene precoce - p138 (BALF2)
4. Antigene nucleare (EBNA-1) - p72 (BKRF1)

Dosaggio IgG

Su tutte le strisce devono essere presenti le bande per il controllo dell'aggiunta del siero (anti-IgG e anti-IgM). Questa bande fungono da controllo interno per l'aggiunta del campione. L'assenza di queste bande in una striscia indica che non è stato aggiunto alcun coniugato o siero o è indice di altri errori operativi.

Individuare e identificare le bande sulle strisce eseguite con il **CONTROLLO REATTIVO** IgG utilizzando la figura in allegato. Registrare le bande reattive sulle strisce del paziente sulla scheda tecnica fornita in dotazione.

Classificare l'intensità delle bande come segue:

Negativa: Nessuna reattività verso le bande antigeniche specifiche dell'EBV.
Oppure se l'intensità di qualsiasi banda antigenica specifica dell'EBV (ad eccezione della EBNA-1 IgG p72) è più debole rispetto alla banda di controllo del siero anti-IgG (se visibile) sulla stessa striscia.

Reattiva: La banda antigenica è ben visibile e la sua intensità è uguale o maggiore a quella della banda di controllo del siero anti-IgG sulla stessa striscia. (Per l'EBNA IgG p72 anche la minima presenza di una banda è considerata reattiva a prescindere dall'intensità della banda di controllo anti-IgG).

Dosaggio IgM

Su tutte le strisce deve essere presente la banda per il controllo dell'aggiunta del siero (anti-IgM). Questa banda funge da controllo interno per l'aggiunta del campione. L'assenza di questa banda su una striscia indica che non è stato aggiunto alcun coniugato o siero o è indice di altri errori operativi.

A volte può essere presente anche la banda per il controllo del siero (anti-IgG) a causa della reattività crociata del coniugato.

Individuare e identificare le bande sulle strisce eseguite con il **CONTROLLO REATTIVO** IgG utilizzando la figura in allegato. Registrare le bande reattive sulle strisce del paziente sulla scheda tecnica fornita in dotazione.

Classificare l'intensità delle bande come segue:

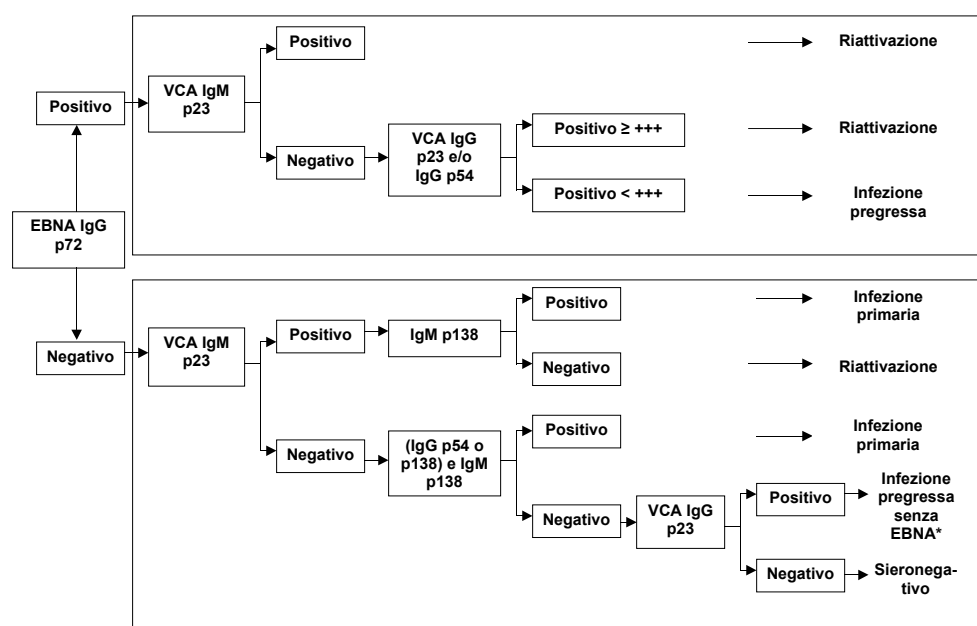
Negativa: Nessuna reattività verso le bande antigeniche specifiche dell'EBV.
Oppure se l'intensità di qualsiasi banda antigenica specifica dell'EBV è più debole rispetto alla banda di controllo del siero anti-IgG (se visibile) sulla stessa striscia.

Reattiva: La banda antigenica è ben visibile e la sua intensità è uguale o maggiore a quella della banda di controllo del siero anti-IgG (se visibile) sulla stessa striscia.

Come linee guida per la valutazione dell'intensità delle bande, considerare l'intensità dei seguenti marcatori sulle strisce di controllo come segue:

1. Banda di controllo del siero anti-IgG nel dosaggio IgG: +/-
2. Banda di controllo del siero anti-IgM nel dosaggio IgG: ++
3. Banda di controllo del siero anti-IgG nel dosaggio IgM: +/- or - (a seconda del campione)
4. Banda di controllo del siero anti-IgM nel dosaggio IgM: +++

CRITERI DI INTERPRETAZIONE



* In caso di IgG VCA p23 ≥ +++ : possibile riattivazione senza EBNA.
Per un'intensità +++, fare riferimento all'intensità della banda di controllo IgM del dosaggio IgM.

LIMITI DELLA METODICA

Per ottenere prestazioni ottimali dai test occorre seguire rigorosamente le procedure illustrate. Qualsiasi deviazione dalla procedura può provocare risultati erranei.

Un risultato NEGATIVO non esclude la possibilità di esposizione o infezione da virus di Epstein Barr.

In uno studio clinico, è possibile che gli anticorpi IgM per p138 o p54 siano presenti in determinati campioni, tuttavia in assenza di altri marcatori è probabile che questi campioni siano sieronegativi.

Nell'EBV IgM/IgG Blot 3.0 di MPD, l'assenza di IgM VCA p23 non preclude la possibilità di una diagnosi di infezione primaria. In questi campioni, è possibile ancora interpretare i risultati del dosaggio come infezione primaria osservando i profili degli anticorpi rispetto agli altri marcatori.

Ne consegue che è possibile che il rilevamento di anticorpi specifici in altri test diagnostici disponibili in commercio possa non presentare concordanza diretta con i risultati ottenuti con l'EBV IgM/IgG Blot 3.0 di MPD, tuttavia è necessario che l'interpretazione finale o la sierodiagnosi di infezione da EBV siano simili. Ad esempio, è possibile che il VCA dell'IgM sia positivo rispetto all'IFA e negativo secondo il blot; tuttavia la sierodiagnosi verrebbe in entrambi i casi interpretata come infezione primaria. Al contrario, la diagnosi di un campione che secondo l'IFA risulta negativo al VCA dell'IgM e positivo secondo il blot, sarebbe sempre infezione da EBV in un campione con riattivazione. Il motivo di questa differenza risiede nella diverso antigene utilizzato e nel diverso metodo di dosaggio.

Nello studio clinico condotto è stato osservato che alcuni campioni in cui erano assenti le IgG dell'EBNA e IgM del VCA, ma presenti le IgG del VCA sono stati considerati campioni di riattivazione se l'intensità IgG del VCA era "++++" o maggiore. In questo caso i campioni potrebbero essere considerati come "Infezione pregressa senza EBNA" o "Riattivazione". In casi simili è necessaria una diagnosi più approfondita basata sui sintomi clinici.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DI ESECUZIONE

Le prestazioni dell'EBV IgM/IgG Blot 3.0 di MPD per il rilevamento di anticorpi IgM e IgG anti-EBV sono state valutate in studi clinici.^{5,9}

Tabella 1: Concordanza dell'interpretazione diagnostica utilizzando l'EBV IgM/IgG Blot 3.0 di MPD e l'IFA su vari gruppi sierologici dell'EBV.

STATO SIEROLOGICO DELL'EBV SECONDO L'IFA	STATO SIEROLOGICO DELL'EBV SECONDO L'EBV IgM/IgG BLOT 3.0
Sieronegativo	76/78 (97,4%)
Infezione primaria	35/37 (94,5%)
Infezione pregressa	26/26 (100%)
Riattivazione	12/14 (85,7%)

Tabella 2: Concordanza dell'interpretazione diagnostica utilizzando l'EBV IgM/IgG Blot 3.0 di MPD e l'IFA su campioni di siero di altre infezioni virali.

TIPO DI	MALATTIA	INTERPRETAZIONE DELL'IFA	INTERPRETAZIONE DEL BLOT
1	Citomegalovirus	Infezione pregressa	Infezione pregressa
2	Citomegalovirus	Sieronegativo	Sieronegativo
3	Citomegalovirus	Infezione pregressa	Infezione pregressa
4	Citomegalovirus	Infezione primaria	Infezione primaria
5	Citomegalovirus	Infezione primaria senza EBNA	Infezione primaria senza EBNA
6	Citomegalovirus	Infezione pregressa con EBNA debole	Infezione pregressa
7	Herpes simplex	Infezione pregressa con EBNA debole	Riattivazione
8	Herpes simplex	Sieronegativo	Sieronegativo
9	Herpes simplex	Sieronegativo	Sieronegativo
10	Herpes simplex	Infezione pregressa con EBNA debole	Infezione pregressa senza EBNA
11	Herpes simplex	Infezione pregressa	Infezione pregressa
12	Herpes simplex	Infezione pregressa	Infezione pregressa
13	Varicella Zooster	Infezione pregressa	Infezione pregressa
14	Varicella Zooster	Infezione pregressa con EBNA debole	Infezione pregressa
15	Epatite A	Riattivazione	Infezione pregressa
16	Epatite A	Infezione pregressa	Infezione pregressa
17	Epatite B	Infezione pregressa senza EBNA	Infezione pregressa
18	Parotite	Sieronegativo	Sieronegativo
19	Parotite	Infezione pregressa	Infezione pregressa
20	Morbillo	Infezione pregressa	Infezione pregressa
21	Morbillo	Infezione pregressa	Infezione pregressa

Concordanza complessiva con i risultati IFA = 19/21 (90,5%)

ESCLUSIONE DI GARANZIA E GARANZIA LIMITATA ESPRESSA

Il produttore non fornisce altra garanzia esplicita per il kit, tranne l'uso come dosaggio diagnostico *in vitro* nel quadro delle specifiche e delle limitazioni indicate nel Manuale di istruzioni del prodotto, sempre se viene usato seguendo le istruzioni ivi fornite. Il produttore non fornisce alcuna garanzia, espresa o implicita, compresa qualsiasi garanzia espresa o implicita di commerciabilità, adeguatezza all'uso o utilità implicita ad altri scopi. Il produttore riconosce solo la sostituzione del prodotto o il rimborso del prezzo di acquisto del prodotto stesso. Il produttore non potrà essere ritenuto responsabile nei confronti dell'acquirente o di terzi per danni, lesioni o danni economici di qualsiasi entità comunque causati dal prodotto nell'uso o nell'applicazione sopra indicati.

PROBLEMI TECNICI / RECLAMI

In caso di problemi tecnici o di reclami, attenersi alla seguente procedura:

1. Annotare il numero di lotto del kit, la data di scadenza e il numero di lotto della striscia.
2. Conservare i kit e risultati ottenuti.
3. Contattare il più vicino centro MP Biomedicals o il proprio distributore locale.

BIBLIOGRAFIA

1. Henle, G., Henle, W., and Diehl, V. (1968). *Relation of Burkitt's tumour-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 59: 94-101.
2. Andersson, J.P. (1991). *Clinical aspects on Epstein-Barr Virus infection*. Scand. J. Infect., 76 (S): 94-104.
3. Reishl U., Gerdes C., Mortz M., and Wolf, H. (1996). *Expression and purification of a Epstein-Barr virus encoded 23-Kda protein and characterization of its immunological properties*. Journal of Virological Methods, 57 (1): 71-85.
4. Mayer, J., Schwaizmann F., Reischl U., and Wolf, H. (1993). *Pathobiology of Epstein-Barr Virus and related diseases*. Biotest Bulletin, 5: 3-12.
5. Hinderer, W., Nebel-Schickel, H., Sonneborn, H. H., Mortz, M., Kuhbeck, R., and Wolf, H. (1988). *Purification of four different recombinant EBV antigens synthesized in E. coli and their diagnostic application*. J. Exp. Cancer Res., 7 (S): 132.
6. Hinderer, W., Hom, J., Nebel-Schickel, H., Vornhagen, R., Sonneborn, H. H., and Wolf, H. (1990). *Serodiagnosis of Epstein-Barr Virus infection: Time for new generation assays provided by recombinant DNA technology*. Biotest Bulletin, 4: 141-146.
7. Henle, G., Henle, W., and Horwitz C.A. (1974). *Antibodies to Epstein-Barr Virus - Associated Nuclear antigen in infectious mononucleosis*. J. Infect. Dis. 130 : 231-239.
8. Buisson, M., Fleurent, B., Mak, M., Morand, P., Chan, L., Ng, A., Guan, M., Chin, D., and Seigneurin, J.M. (1999). *Novel immunoblot assay using four recombinant antigens for diagnosis of Epstein-Barr Virus primary infection and reactivation*. J. Clin. Microbiol, 37 (8): 2709-2714.
9. Gartner, B., Fischinger, M., Roemer, K., Mak, M., Fleurent, B., and Mueller-Lantzsch, N. (2001). *Evaluation of a Recombinant line blot for diagnosis of Epstein-Barr Virus compared with ELIA, using immunofluorescence as reference method*. J. Virol Methods 93, 89 - 96.

MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd.
85 Science Park Drive
#04-01, The Cavendish
Singapore Science Park
Singapore 118259
N. tel. : + 65 6775 0008
N. fax : + 65 6775 4536
E-mail : enquiry_ap@mpbio.com

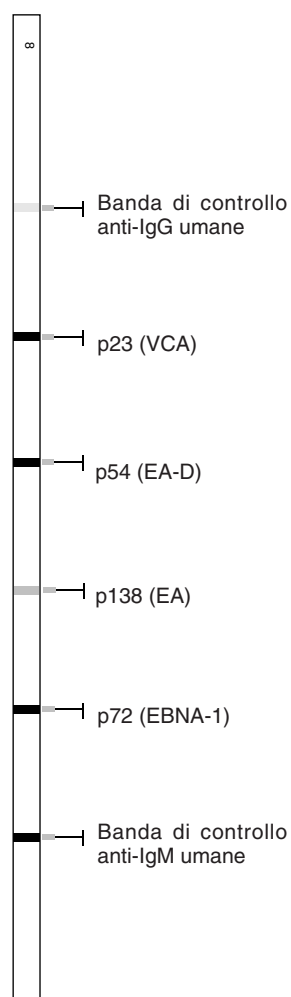
EC REP
Medical Technology Promed
Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert
Germania
N. tel. : + 49 68 94 58 1020
N. fax : + 49 68 94 58 1020
E-mail : info@mt-procons.com

Sedi regionali:

MP Biomedicals Suisse S.A.
Halle de Fret/Aéroport
P.O. Box 1015
1211 Ginevra 5
Svizzera
N. tel. : (4122) 788-1908
N. fax : (4122) 788-1986
E-mail: mpbiosuisse@mpbio.com

* Il nome e il logo Genelabs sono concessi in licenza da Genelabs Technologies, Inc.

FIGURA 1



Nota:

1. La banda di controllo delle anti-IgG umane appare come una banda indistinta (di intensità +/-) in un dosaggio IgG. In un dosaggio IgM può essere presente o assente.
2. L'intensità di una banda di controllo delle anti-IgG umane viene utilizzata come linea di demarcazione sia nei dosaggi IgG che in quelli IgM, ovvero qualsiasi banda di pari o maggiore intensità rispetto alla banda di controllo dell'IgG è considerata positiva mentre qualsiasi banda con intensità inferiore è considerata negativa.