













SeraSpot® Anti-EBV-4 IgG SeraSpot® Anti-EBV-3 IgM

Spotimmunoassay zum Nachweis von IgG- oder IgM-Antikörpern gegen *Epstein-Barr-Virus* (EBV) in humanem Serum oder Plasma

 SP-013-4 G-S6  48  SP-013-4 G-S12  96  SP-013-4 G-S24  2x 96

 *In-vitro*-Diagnostikum 

 SP-013-3 M-S6  48  SP-013-3 M-S12  96  SP-013-3 M-S24  2x 96

 *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Sprehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 33767 791-10 · Fax +49 33767 791-99 · info@seramun.com

Einführung

Das *Epstein-Barr-Virus* (EBV, auch *Humanes-Herpes-Virus 4*) ist ein kleines, behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus aus der Familie der *Herpesviridae*. Die DNA weist interne und terminale repetitive Sequenzen auf, wobei die terminalen Sequenzen eine Ringbildung der DNA für die Replikation ermöglichen.

Das EBV ist der ätiologische Erreger der infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches-Drüsenfieber). Nach einer symptomatischen oder asymptomatischen EBV-Infektion kann das Virus lebenslang im Körper persistieren. Das Virus wird hauptsächlich über Speichel übertragen (Kontaktinfektion), seltener sind Übertragungen im Rahmen von Transplantationen oder Bluttransfusionen. Im Alter von 4 Jahren liegt die Durchseuchungsrate bei 50 %, ab dem 20. Lebensjahr bei 90 % und ab dem 50. Lebensjahr bei 99 %.

Eine Infektion im Kindesalter verläuft meist asymptomatisch, während es bei Jugendlichen und Erwachsenen in 30 bis 60 % aller Fälle zum Ausbruch der infektiösen Mononukleose kommt. Nach einer Inkubationszeit von 10 bis 50 Tagen (die durchschnittliche Inkubationszeit beträgt 10 bis 14 Tage) können die ersten Symptome auftreten. Die häufigsten Symptome sind Fieber, Lymphadenopathie (Lymphknotenschwellung), Hepatosplenomegalie (Vergrößerung der Leber und der Milz), Pharyngitis (Rachenentzündung) und Tonsillitis (Mandelentzündung). Bei Kindern kann eine respiratorische Symptomatik im Vordergrund stehen. Bei immunkompetenten Personen verläuft die Krankheit selbstlimitierend und dauert selten länger als 3 Wochen.

Besonders bei immunsupprimierten Patienten wird EBV mit verschiedenen lymphoproliferativen Erkrankungen in Verbindung gebracht, wie dem Burkitt-Lymphom (Lymphdrüsenkrebs) und dem Nasopharynxkarzinom (Nasenrachenkrebs).

Bei Erstkontakt mit EBV werden Epithelzellen und B-Lymphozyten im Oropharyngealtrakt (Mund-Rachen-Trakt) infiziert. Das Virus wird über die B-Lymphozyten im ganzen Körper verbreitet. Die Infektion kann einen lytischen oder auch einen latenten Verlauf nehmen.

Die lytische Infektion betrifft üblicherweise Epithelzellen und führt zu einer Zerstörung der infizierten Zellen und zur Freisetzung von Viruspartikeln. Während dieser lytischen Phase werden regulatorische Proteine, welche zur Gruppe der „immediately early antigen“ (IEA) und „early antigen“ (EA) gehören, synthetisiert, um die Produktion der viralen DNA, Strukturkomponenten des Virions („viral capsid antigen“ (VCA)) und Membranproteine (MA) zu ermöglichen. Die Genprodukte besitzen antigenen Charakter und lösen die Bildung von Antikörpern aus.

B-Lymphozyten werden in der Regel latent infiziert. Dabei liegt das virale Genom im Zellkern der infizierten Zelle in extrachromosomaler Form (Episom) vor. Dies führt zu einer Immortalisation der B-Zellen und zu deren Transformation in kontinuierlich wachsende Blasten. Bei immunkompetenten Personen wird das Wachstum der transformierten Zellen durch cytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen kontrolliert. Besonders die CD8+ T-Zellen sind gegen Antigene der lytischen und der latenten Phase gerichtet. Die Immunantwort ist jedoch nicht ausreichend, um eine komplette Vernichtung der infizierten Zellen zu gewährleisten. Somit kann das Virus im Organismus persistieren.

Während der latenten Phase werden „EBV nuclear antigens“ (EBNAs) und 3 latente Membranproteine (LMPs) in den infizierten Zellen exprimiert. Die EBNAs repräsentieren einen Komplex aus mindestens 6 Proteinen (EBNA 1-6). EBNA-1 ist für die Aufrechterhaltung des episomalen Status der EBV-DNA verantwortlich.

Die EBV Reaktivierung, die während der latenten Phase stattfinden kann, wird durch die Rezirkulation der infizierten B-Zellen im Lymphgewebe ermöglicht, welche sich zu Plasmazellen differenzieren.

Die humorale Immunantwort enthält Antikörper gegen Antigene der lytischen und der latenten Phase:

Antikörper gegen EA zeigen 2 verschiedene Muster: diffuses Muster (EA-D) und beschränktes Muster (EA-R). EA-D (IgG) steigt während den ersten 3-4 Wochen an und ist nach 3-4 Monaten nicht mehr detektierbar. Ungefähr 85 % der Patienten mit akuter Infektion sind positiv für EA-D (bis zu 3 Monate nach Symptombeginn). In einigen Fällen können die Antikörper sogar noch Jahre nach der Primärinfektion detektiert werden. Bei einer EBV-Reaktivierung (bei Immunsuppression) und bei Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom können ebenfalls hohe EA-D-spezifische Antikörpertiter beobachtet werden.

IgG-Antikörper gegen das Kapsid-Antigen VCA treten typischerweise zur selben Zeit auf, wie die ersten klinischen Symptome bei einer akuten Infektion und bleiben ein Leben lang erhalten. IgM-Antikörper treten ebenfalls zur gleichen Zeit auf wie IgG-Antikörper gegen VCA, verschwinden jedoch innerhalb weniger Wochen.

EBNA-1 IgG-Antikörper sind in den ersten 3-4 Wochen nach Beginn der Symptomatik nicht detektierbar und sind somit ein Marker für eine zurückliegende Infektion. Allerdings wird Anti-EBNA-1 von 5 % der Patienten nicht gebildet. Ein negatives Anti-EBNA-1 im IgG kann daher bei gleichzeitig positivem VCA-IgG zu einer falsch positiven Diagnose einer akuten Infektion führen. Bei 7 % der Proben in der Laborroutine tritt VCA-IgG isoliert auf.

p18 (VCA) stellt einen weiteren Spätmarker dar, der im Gegensatz zu EBNA-1 nur selten nicht gebildet wird.

Durch die Verwendung von nur 3 Parametern (VCA IgG, VCA IgM, EBNA-1 IgG) kann bei immunkompetenten Patienten in der Regel sehr einfach zwischen einer akuten und einer abgelaufenen Infektion unterschieden werden. Bei immunsupprimierten Patienten ist die Interpretation von Antikörperreaktivitäten schwierig. Durch die Fehlfunktion des Immunsystems und dem Fakt, dass die Erhaltung der Antikörper variieren kann (abhängig von der Dynamik der Erkrankung), kann es somit zu untypischen Mustern im Antikörperprofil kommen.

Für gewöhnlich werden in der Diagnostik Screening-Teste für EA IgG, EBNA-1 IgG, VCA IgG und VCA IgM, welche Immunfluoreszenz-Assays (IFAs), Enzymimmuno-Assays (EIAs) und Chemilumineszenz-Immunoassays (CLIAs) sein können, verwendet. IFAs verwenden normalerweise EBV-transformierte B-Zellen von Patienten mit Burkitt-Lymphom. EIAs und CLIAs verwenden hingegen gereinigte native oder rekombinante Proteine, synthetische Peptide oder Fusionsproteine.

Als Bestätigungsteste werden Immunoblotassays bzw. Line-Immunoassays eingesetzt, welche virale Lysate von EBV-transformierten Zellen bzw. rekombinante Antigene verwenden. Besonders für die Unterscheidung zwischen akuter und abgelaufener Infektion (für den Fall, dass VCA-IgG positiv aber EBNA-1-IgG und VCA-IgM negativ ist) sind Immunoblotassays bzw. Line-Immunoassays gut geeignet.

Literatur:

1. Andersson, A., Vetter, V., Kreutzer, L., Bauer, G.: Avidities of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr virus serology, *J. Med. Virol.* 43: 238-244, 1994
2. Bauer, G.: Simplicity through complexity: Immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein-Barr virus serology, *Clin. Lab.* 47: 223-230, 2001
3. Bauer, G.: The rational basis for efficient Epstein-Barr virus (EBV) serology, *Clin. Lab.* 41: 623-634, 1995
4. Buisson, M., Fleurent, B., Mak, M., Morand, P., Chan, L., Ng, A., Guan, M., Chin, D., Seignerin, J. M.: Novel immunoblot assay using four recombinant antigens for diagnosis of Epstein-Barr virus primary infection and reactivation, *J. Clin. Microbiol.* 37(8): 2709-2714, 1999
5. Callan, M. F., Tan, L., Annel, N., Ogg, G. S., Wilson, J. D., O'Callaghan, C. A., Steven, N., McMichael, A. J., Rickinson, A. B.: Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *In vivo*, *J. Exp. Med.* 187: 1395-1402, 1998
6. Coyle, P. V., Wyatt, D., Connolly, J. H., Lynch, G. A.: Antibodies to Epstein-Barr virus in patients with nasopharyngeal carcinoma in Northern Ireland, *Ir. J. Med.* 156: 182-184, 1987
7. De Paschale, M., Agrappi, C., Manco, M. T., Mirri, P., Viganò, E. F., Clerici, P.: Seroepidemiology of EBV and interpretation of the „isolated VCA IgG“ pattern, *J. Med. Virol.* 81: 325-331, 2009
8. De Paschale, M., Clerici, P.: Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions, *World J. Virol.* 1(1): 31-43, 2012
9. Evans, A. S., Niedermann, J. C., Cenabre, L. C., West, B., Richards, V. A.: A prospective evaluation of heterophile and EBV specific Ig; antibody tests in clinical and subclinical infectious mononucleosis, *J. Infect. Dis.* 132: 546-554, 1975
10. Fleisher, G., Henle, W., Henle, G., Lennette, E. T., Biggar, R. J.: Primary infection with Epstein-Barr virus in infants in the United States: clinical and serologic observations, *J. Infect. Dis.* 139: 553-558, 1975
11. Gärtner, B. C., Hess, R. D., Bandt, D., Kruse, A., Rethwilm, A., Römer, K., Müller-Lantzsch, N.: Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10: 78-82, 2003
12. Gärtner, B. C., Kortmann, K., Schäfer, M., Müller-Lantzsch, N., Sester, U., Kaul, H., Pees, H.: No correlation in Epstein-Barr virus reactivation between serological parameters and viral load, *J. Clin. Microbiol.* 38: 2458, 2000
13. Gärtner, B. C., Müller-Lantzsch, N.: Epstein-Barr-Virus, *Mikrobiologische Diagnostik*, 2009
14. Gulley, M. L., Tang, W.: Laboratory assays for Epstein-Barr virus related disease, *J. Mol. Diagn.* 10: 279-292, 2008
15. Henle, G., Henle, W.: Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma, *J. Bacteriol.* 91: 1248-1256, 1966
16. Henle, W., Henle, G.: Epstein-Barr virus-specific serology in immunologically compromised individuals, *Cancer Res.* 41, 4222-4225, 1981
17. Henle, W., Henle, G., Andersson, J., Ernberg, I., Klein, G., Horwitz, C. A., Marklund, G., Rymo, L., Wellinder, C., Straus, S. E.: Antibody response to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 570-574, 1987
18. Hess, R. D.: Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years, *J. Clin. Microbiol.* 42(8): 3381-3387, 2004
19. Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D., Rickinson, A. B.: Cellular response to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus, *Annu. Rev. Immunol.* 25: 587-617, 2007
20. Holmes, R. D., Sokol, R. J.: Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr. Transplant.* 6: 456-464, 2002
21. Inoue, N. et al.: Use of enzyme-linked immunosorbent assays with chimeric fusion proteins to titrate antibodies against Epstein-Barr virus nuclear antigen 1, *Clin. Micro.* 30(6): 1442-1448, 1992
22. Jenson, H. B.: Virologic Diagnosis, Viral Monitoring, and Treatment of Epstein-Barr Virus Infectious Mononucleosis, *Curr. Infect. Dis. Rep.* 6: 200-207, 2004
23. Klemola, E., von Essen, R., Henle, G., Henle, W.: IM-like disease with negative heterophile agglutination test, *J. Infect. Dis.* 121: 608-614, 1970
24. Lamy, M. E., Favart, A. M., Cornu, C., Mendez, M., Segas, M., Burtonboy, G.: Study of Epstein-Barr virus (EBV) antibodies: IgG and IgM anti-VCA, IgG anti-EA and Ig anti-EBNA obtained with an original microtiter technique: -serological criteria of primary and recurrent EBV infections and follow-up of infectious mononucleosis—seroepidemiology of EBV in Belgium based on 5178 sera from patients, *Acta. Clin. Belg.* 37: 281-298, 1982

25. Leight, E. R., Sugden, B.: EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus, *Rev. Med. Virol.* 10: 83-100, 2000
26. Lennette, E. T., Henle, W.: Epstein-Barr virus infections: clinical and serological features, *Lab. Manage.* 25: 23-28, 1987
27. Linde, A.: Diagnosis and pathogenesis of infectious mononucleosis and other Epstein-Barr virus associated diseases, *Rev. Med. Microbiol.* 3: 43-51, 1992
28. Linde, A.: Diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases, *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 100: 83-88, 1996
29. Linde, A., Kallin, B., Dillner, J., Andersson, J., Jägdahl, L., Lindvall, A., Wahren, B.: Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays with two synthetic peptides of Epstein-Barr virus for infectious mononucleosis, *J. Infect. Dis.* 161: 903-909, 1990
30. Kampmann, M., Henninger, K., Bauer, G.: Determination of antibodies directed specifically against Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) by anticomplementary immunofluorescence (ACIF), *Med. Microbiol.* 2: 1-8, 1993
31. Niedobitek, G., Hamilton-Dutoit, S., Herbst, H., Finn, T., Vetner, M., Pallesen, G., Stein, H.: Identification of Epstein-Barr virus-infected cells in tonsils of acute infectious mononucleosis by *in situ* hybridization, *Hum. Pathol.* 20: 796-799, 1989
32. Nikoskelainen, J., Lelkola, J., Lelkola E.: IgM antibodies specific for EBV in IM without heterophile agglutination test, *Br. Med. J.* 4: 72-75, 1974
33. Nikoskelainen, J., Neel, E. U., Stevens, D. A.: Epstein-Barr virus-specific serum immunoglobulin A as an acute-phase antibody in infectious mononucleosis, *J. Clin. Microbiol.* 10: 75-79, 1979
34. Reedman, B. M., Klein, G.: Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines, *Int. J. Cancer.* 11: 499-520, 1973
35. Rickinson, A. B., Kieff, E.: Epstein-Barr virus, In: Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Martin, M. A., Lamb, R. A., Roizman, B., editors, *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins: 2575-2627, 2001
36. Schillinger, M., Kampmann, M., Henninger, K., Murray, G., Hanselmann, I., Bauer, G.: Variability of humoral immune response to acute Epstein-Barr virus (EBV) infection: evaluation of the significance of serological marker, *Med. Microbiol. Letters* 2: 296-303, 1993
37. Schmitz, H., Volz, D., Krainlek-Richert, C. H., Schere, M.: Acute EBV infections in Children, *Med. Microbiol. Immunol.* 158: 58-63; 1972
38. Schubert, J., Zens, W., Weissbrich, B.: Comparative evaluation of the use of immunoblots and of IgG avidity assays as confirmatory tests for the diagnosis of acute EBV infections, *J. Clin. Virol. Methods* 11: 161-172, 1998
39. Straus, S. E., Cohen, J. I., Tosato, G., Meier, J., NIH conference: Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management, *Ann. Intern. Med.* 118: 45-58, 1993
40. Svahn, A., Magnusson, M., Jägdahl, L., Schloss, L., Kahlmeter, G., Linde, A.: Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays and two latex agglutination assays for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection, *J. Clin. Microbiol.* 35: 2728-2832, 1997
41. Sumya, C. V., Ench, Y.: Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children, II, Heterophil antibody and viral-specific responses, *Paediatrics.* 75:1011-1019, 1985
42. Thorley-Lawson, D. A.: Epstein-Barr virus: exploiting the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 1: 75-82, 2001
43. Tierney, R. J., Steven, N., Young, L. S., Rickinson, A. B.: Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state, *J. Virol.* 68: 7374-7385, 1994
44. Yao, Q. Y., Rickinson, A. B., Epstein, M. A.: A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals, *Int. J. Cancer* 35: 35-42, 1985
45. Van Gunsven, W. M. J., A. Nabbe, and J.M. Middeldorp: Identification and molecular characterization of two diagnostically relevant marker proteins of the Epstein-Barr virus capsid antigen, *J. Med. Virol.* 40:161-169, 1993
46. Van Grunsvan, W. M. J., W. J. M. Spaan, and Middeldorp: Localization and diagnostic application of immunodominant domains of the BFRF3-encoded Epstein-Barr virus capsid protein, *J. Infect. Dis.* 170:13-19, 1994
47. Tranchand-Bunel, D., C. Auriault, E. Diesis, and H. Gras-Masse: Detection of human antibodies using "convergent" combinatorial peptide libraries or "mixotopes" designed from non-variable antigen: application to the EBV viral capsid antigen p18, *J. Pept. Res.* 52:495-508, 1998
48. Tranchand-Bunel, D., H. Gras-Masse, B. Bourez, L. Dedecker, and C. Auriault: Evaluation of an Epstein-Barr Virus (EBV) Immunoglobulin M Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using a Synthetic Convergent Peptide Library, or Mixotope, for Diagnosis of Primary EBV Infection, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1), 2366-2368, 1999

Anwendungsbereich

Der **SeraSpot® Anti-EBV-4 IgG / SeraSpot® Anti-EBV-3 IgM Test** ist ein *In-vitro*-Diagnostikum (Spotimmunoassay, SIA) zum Nachweis von EBV-spezifischen IgG- bzw. IgM-Antikörpern in humanem Serum oder Plasma.

Testprinzip

Der **SeraSpot® Anti-EBV-4 IgG / SeraSpot® Anti-EBV-3 IgM Test** ist ein Festphasenimmunoassay basierend auf der Verwendung rekombinanter EBV-Antigene, die in Arrayanordnung (Spotarray) auf den Boden der Kavitäten von 96well-Mikrotiterplatten fixiert sind, und die als Fängermoleküle für Antikörper gegen EBV-Antigene dienen. Spezifisch gebundene Antikörper werden mit Peroxidase-(POD)-markierten anti-human IgG- bzw. IgM-Antikörpern und einer nachgeschalteten Substratreaktion mit Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen. An den Stellen, an welchen sich Immunkomplexe ausgebildet haben, entwickeln sich blaue Spots durch Präzipitations-Produkte der farblosen Substratlösung. Die Farbintensität der Spots korreliert mit der Antikörperkonzentration. Die schwach- bis dunkelblauen Spots sind ohne Hilfsmittel sichtbar.

Der Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Inkubation der zu untersuchenden Proben bei Raumtemperatur für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1 : 101 in den ausgewählten Kavitäten. Entfernung der nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 2

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit POD-markierten Konjugatantikörpern gegen humane Antikörper vom IgG- bzw. IgM-Typ. Entfernung der nicht gebundenen Konjugatantikörper durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 3

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit Substratlösung SeramunBlau® spot dark. Stoppen der Reaktion durch Absaugen der Substratlösung. Entfernen von Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch. Die Färbung der entwickelten Arrays ist bei dunkler Lagerung stabil.

Innerhalb von 24 h nach Beendigung der Nachweisreaktion können von den entwickelten Analysen mit den Scannern Seramun *SpotSight®* plate oder Seramun *SpotSight®* strip Bildaufnahmen der Kavitäten (Images) erstellt und unter Verwendung der Software Seramun *SpotSight®* scan quantitativ analysiert werden. Unter Berücksichtigung der testspezifischen Auswertekriterien wird das Testergebnis ermittelt.

Verwendete EBV Antigene

Bezeichnung	Charakterisierung	Bedeutung	Herkunft
EBNA-1	Epstein-Barr Nuclear Antigen-1	IgG-Antikörper gegen EBNA-1 gelten als sichere Marker für eine abgelaufene EBV-Infektion. Bei einigen Patienten können die IgG-Antikörpertiter gegen EBNA-1 stark abfallen (sekundärer EBNA-1-Verlust).	rekombinant
VCA p18	Virus Capsid Antigen, p18	IgM- und IgG-Antikörper gegen das VCA p18 gelten als spezifische Marker für eine EBV-Infektion. IgM-Antikörper sind sehr früh nachweisbar, fallen später ab und werden durch die IgG-Antikörper-Antwort abgelöst. VCA p18-IgG-Antikörper persistieren meist lebenslang.	rekombinant
EA-D p54	Early Antigen-Diffuse, p54	EA-D wird als sogenanntes frühes Antigen beschrieben. Es ist an der Replikation der viralen DNA beteiligt. IgG-Antikörper gegen EA-D können bei Primärinfektionen auftreten. EA-D-Antikörper treten oft auch bei Patienten mit Nasopharyngealkarzinom auf.	rekombinant
VCA gp125	Virus Capsid Antigen, Glykoprotein125	Das Glykoprotein 125 ist eines der "Virus Capsid Antigene". Als immundominant sind die Proteine gp125 und p18 zu nennen. IgM-Antikörper gegen VCA gp125 treten meist sehr früh bei einer Primärinfektion auf. VCA gp125-IgG-Antikörper persistieren meist lebenslang.	rekombinant

Testkomponenten

		Für 48 Bestimmungen	Für 96 Bestimmungen	Für 2x96 Bestimmungen	
1	WELLS	Kavitäten mit Arrays	6 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
IgG-Bestimmung: Farbmarkierung rot; IgM-Bestimmung: Farbmarkierung orange					
2	WASHBUF CONC 10X	Waschpuffer Seramun® Wash buffer A	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	2x 100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe
3	DIL	Probenverdünnungs- puffer Seramun® Sample diluent B	55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe	2x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe	4x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe
4	CONJ HRP IgG	Anti-human IgG- POD- Konjugat	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe
	CONJ HRP IgM	Anti-human IgM- POD- Konjugat	8 ml gebrauchsfertig grün gefärbt transparente Flasche grüne Kappe	8 ml gebrauchsfertig grün gefärbt transparente Flasche grüne Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig grün gefärbt transparente Flasche grüne Kappe
5	SUBSTR TMB	Substrat SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe	8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig schwarze Flasche blaue Kappe
6	COVER	Abdeckfolie	2x	2x	4x
7	SWAB	Tupfer mit 70 % (v/v) Isopropylalkohol	3x2	6x2	12x2

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Proben sollten steril entnommen und maximal 48 Stunden bei 2...8 °C gelagert werden. Serum sollte nach der Gerinnung so schnell wie möglich abzentrifugiert werden. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei -20 °C zu lagern. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden.

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparin-Plasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 101 (z.B. 10 µl Probe und 1000 µl Puffer) mit dem gebrauchsfertigen Probenverdünnungspuffer verdünnt.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- Einstellbare Einkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen
- Einstellbare Mehrkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen
- Reagenziencontainer für Mehrkanal-Mikropipetten
- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Fusselfreies Filterpapier
- Teströhrchen (1 ml) zur Probenverdünnung
- Becherglas und Messzylinder
- Stoppuhr
- Washer für 96well-Mikrotiterplatten (optional)
- Auffanggefäß für infektiöse Lösungen
- Seramun SpotSight® plate oder Seramun SpotSight® strip Scanner mit Auswertesoftware Seramun SpotSight® scan

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 1x 48, 1x 96 oder 2x 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und vakuumversiegelten Testkomponenten ist bei 2...8 °C-Lagerung bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C mindestens 3 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei einer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 4 Wochen und bei einer Lagerung bei RT bis zu 2 Wochen verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien und die vakuumversiegelten Testkomponenten auf Raumtemperatur zu erwärmen. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenbeutel in den Folienbeutel zurücklegen und verschließen.

1 Teil Waschpufferkonzentrat **WASHBUF CONC 10X** mit 9 Teilen destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen. Beispiel: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser. Die Waschlösung ist vor Verwendung gründlich zu durchmischen. Das Substrat **SUBSTR TMB** ist vor direktem Lichteinfall zu schützen! Der Test darf nicht durchgeführt werden, sollte die Substratlösung **SUBSTR TMB** dunkel gefärbt oder dunkle Partikel aufweisen!

Arbeitsplatzanforderungen

Für die Durchführung von Spotimmunoassays wird ein sauberer und faserfreier Arbeitsplatz benötigt. An der Unterseite der Kavitäten anheftende Fasern führen zu fehlerhaften Resultaten. Arbeitsplatz und Kit-Komponenten sollten nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt sein.

Testdurchführung

Durchführung bei Raumtemperatur (18...25 °C). Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Für die Handhabung der SeraSpot® Teste wird empfohlen, den Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) zu verwenden. Der Kit ist zum mehrfachen Gebrauch konzipiert.

Wichtige Hinweise:

- **Mechanischer Kontakt (Kratzen) auf dem Boden der Kavitäten mit Pipettenspitzen oder Washer-Nadeln ist zu vermeiden. Dadurch wird der Array irreparabel geschädigt!**
- **Alle Flüssigreagenzien (Probe, Konjugat und Substrat) sind blasenfrei in die Kavitäten einzubringen!**
- **Vor dem Erstellen von Images der entwickelten Kavitäten ist es notwendig, die Unterseite der Kavitäten von anhaftenden Fusseln, mit dem im Kit enthaltenen Tupfer **SWAB** zu reinigen!**
- **Durch die Trocknung der Restflüssigkeit erscheinen die Images kontrastreicher, dadurch kann es bei wiederholtem Scannen zu geringfügigen Abweichungen der Messwerte kommen. Die Bewertung der einzelnen Parameter wird dadurch nicht verändert.**

Arbeitsschritte

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten **WELLS** auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. **100 µl** 1:101 verdünnte Probe pro Kavität pipettieren. Herstellung der Arbeitsverdünnung der Patientenprobe z.B. 10 µl Serum + 1000 µl Probenverdünnungspuffer.
3. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
4. **Lösungen absaugen.** Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung, hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**, waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
5. **50 µl** des gebrauchsfertigen Konjugates **CONJ HRP IgG** oder **CONJ HRP IgM** pro Kavität pipettieren.
6. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
7. **L** **Lösungen absaugen.** Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung, hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**, waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
8. **50 µl** der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung **SUBSTR TMB** pro Kavität pipettieren.
9. Platte abdecken und lichtgeschützt für **30 min** bei RT inkubieren.
10. Substratlösung absaugen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
11. Unterseite der Kavitäten mit Tupfer **SWAB** abwischen.
12. Bildaufnahme der Kavitäten mit dem Scanner Seramun SpotSight® plate / Seramun SpotSight® strip und Imageanalyse mit der Software Seramun SpotSight® scan. Erfolgt die Bildaufnahme mit dem Scanner Seramun SpotSight® strip, sind die Mikrotiterplattenstreifen aus dem Rahmen zu entnehmen und in die Streifenaufnahme des Scanners einzulegen.

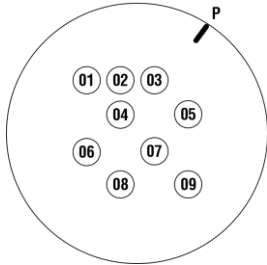
Die Durchführung der Absaug- und Waschschrirte kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Washers erfolgen.

Nach dem Absaugen der Substratlösung sind die entwickelten Spots in der Platte bei Aufbewahrung im Dunkeln 24 Stunden stabil.

Auswertung der Ergebnisse

Arraylayout IgG-Nachweis

SP-013-4 G



Parameter

04	EBNA-1
05	VCA p18
06	EA-D p54
07	VCA gp125

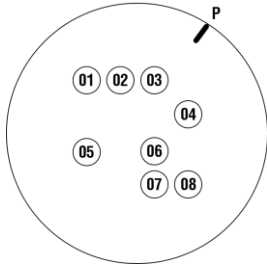
Kontrollen

01	Positivkontrolle (PC)
02	Cut-off Kontrolle (CO)
03	Negativkontrolle (NC)
08	IgG Konjugatkontrolle (GC)
09	Serumkontrolle (SC)

P Positionsmarkierung

Arraylayout IgM-Nachweis

SP-013-3 M



Parameter

04	VCA p18
05	EA-D p54
06	VCA gp125

Kontrollen

01	Positivkontrolle (PC)
02	Cut-off Kontrolle (CO)
03	Negativkontrolle (NC)
07	IgM Konjugatkontrolle (MC)
08	Serumkontrolle (SC)

P Positionsmarkierung

Gültigkeitskriterien für den Test

Der *SeraSpot*[®] Anti-EBV-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-EBV-3 IgM Test enthält die folgenden Kontrollspots:

1. Positivkontrolle (PC). Intensiv gefärbter Spot, dunkler als Cut-off Kontrolle. Immer angefärbt.
2. Cut-off Kontrolle (CO). Schwach gefärbter Spot. Wird für die Bewertung der Parameterspezifischen Signale verwendet.
3. Negativkontrolle (NC). Sehr schwach gefärbter Spot, die Farbintensität der Negativkontrolle muss kleiner als die der Cut-off Kontrolle sein.
4. Konjugatkontrolle (GC, MC; IgG-, IgM- Funktionskontrolle). Intensiv gefärbte Spots mit unterschiedlicher Position beim IgG- bzw. IgM-Nachweis. Dient zur Kontrolle des Antikörperisotyps.
5. Serumkontrolle (SC). Intensiv gefärbter Spot, immer angefärbt, wenn sich Probe im Well befinden hat. Ein Wegbleiben der Färbung des Spots der Serumkontrolle deutet auf das Fehlen von Probe hin.

Der Test kann nicht ausgewertet werden, wenn eine der unter Punkt 1. bis 5. aufgeführten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt ist.

Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung erfolgt unter Verwendung der *SeraSpot*[®] Mess- und Auswertetechnik. Eine visuelle Plausibilitätskontrolle ist mit Hilfe der im Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) enthaltenen Lupe möglich.

Bewertung	IgG	IgM
negativ	kein Antigen-Spot > Cut-off-Kontrolle	kein Antigen-Spot > Cut-off-Kontrolle oder EA-D p54 > Cut-off-Kontrolle
positiv	ein oder mehrere Antigen-Spots > Cut-off-Kontrolle	ein oder mehrere Antigen-Spots außer EA-D p54 isoliert > Cut-off-Kontrolle

Vorgeschlagene Interpretation der Testergebnisse

Kategorie	IgG	IgM	Interpretation
1	EBNA-1 negativ	positiv	Hinweis auf eine Primärinfektion.
2	EBNA-1 positiv	negativ	Hinweis auf eine abgelaufene EBV-Infektion.
3	EBNA-1 negativ und VCA p18 + VCA gp125 positiv	negativ	Hinweis auf eine abgelaufene EBV-Infektion.
4	negativ	negativ	Keine Antikörper gegen EBV-Antigene nachweisbar.
5	alle anderen Reaktivitäten*	alle anderen Reaktivitäten*	Befund unklar (Kontrolle empfohlen).

*Bei einer EBV-Reaktivierung können unterschiedliche Antikörper-Reaktivitäten auftreten. Eine EBV-Reaktivierung kann nicht durch ein bestimmtes Antikörperreaktivitätsprofil ermittelt werden.

Grenzen der Methode

Eine Interpretation der Ergebnisse muss in enger Verbindung mit klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Kontaminationen der Reagenzien oder Proben durch Bakterien oder Pilze können zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben (Konzentration bis zu 500 mg/dl Hämoglobin, 1000 mg/dl Lipide und 20 mg/dl Bilirubin C / Bilirubin F) und Rheumafaktoren (500 IU/ml) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse.

Testdurchführung

Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können zu falschen Ergebnissen führen.

Das Einbringen von Luftblasen beim Pipettieren der Proben und/oder Reagenzien bewirkt eine ungleichmäßige Signalausbildung des Arrays, wodurch eine Auswertung nicht mehr möglich ist.

Durch Kratzer auf dem Wellboden beschädigte Arrays sind für die Auswertung nicht verwendbar.

Im Arraybereich anhaftende Fasern oder Partikel interferieren mit der Imageanalyse.

Leistungsmerkmale

Sensitivität und Spezifität

1. Vergleichende Untersuchung serologisch vorcharakterisierter Proben

Serologisch vorcharakterisierte Proben von Patienten mit Verdacht auf eine EBV-Infektion (n = 130 (IgG-Nachweis), n = 132 (IgM-Nachweis)) wurden im *SeraSpot*[®] Anti-EBV-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-EBV-3 IgM Test untersucht. Proben mit diskrepanten Resultaten wurden in einem zweiten Assay zum EBV-Antikörper-Nachweis nachgetestet, wobei die im Referenztest 2 erzielten Ergebnisse der endgültigen Statusbestimmung der im *SeraSpot*[®]-Test zum Referenztest 1 diskrepant bestimmten Proben dienen („Berichtigte Sensitivität“ / „Berichtigte Spezifität“).

IgG		n = 130	Referenztest 1	
			positiv (n = 84)	negativ (n = 46)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-EBV-4 IgG	positiv	82	2	
	negativ	2	44	

Initiale Sensitivität: **97,6 %**

Berichtigte Sensitivität: **97,7 %**

Initiale Spezifität: **95,7 %**

Berichtigte Spezifität: **97,8 %**

IgM		n = 132	Referenztest 1	
			positiv (n = 22)	negativ (n = 110)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-EBV-3 IgM	positiv	20	3	
	negativ	2	107	

Initiale Sensitivität: **90,9 %**

Berichtigte Sensitivität: **92,0 %**

Initiale Spezifität: **97,3 %**

Berichtigte Spezifität: **100 %**

Präzision

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität wurden im *SeraSpot*[®] Anti-EBV-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-EBV-3 IgM Test untersucht und das Verhältnis von Farbintensitäten der Antigenspots zur Cut-Off Kontrolle (Ratio) gemessen. Aus den erhaltenen Messwerten (Mittelwert) wurden die Variationskoeffizienten (VK) ermittelt.

IgG-Nachweis						
	Intra-Assay-VK		Inter-Assay-VK		Inter-Chargen-VK	
	Ratio [\bar{x}] n = 48	VK* [%]	Ratio [\bar{x}] n = 80	VK* [%]	Ratio [\bar{x}] n = 240	VK* [%]
EBNA-1	1,23	8,94	1,30	9,27	1,39	11,58
VCA p18	1,83	8,16	1,63	12,98	1,63	14,61
EA-D p54	1,56	9,03	1,24	19,18	1,10	24,20
VCA gp125	1,04	8,71	1,34	16,92	1,28	18,86
Durchführung	1 Bearbeiter, 48x Bestimmung, 1 Charge		2 Bearbeiter pro Tag, 2x Bestimmung, 20 Tage, 1 Charge		2 Bearbeiter pro Tag, 2x Bestimmung, 20 Tage, 3 Chargen	

IgM-Nachweis						
	Intra-Assay-VK		Inter-Assay-VK		Inter-Chargen-VK	
	Ratio [\bar{x}] n = 48	VK* [%]	Ratio [\bar{x}] n = 80	VK* [%]	Ratio [\bar{x}] n = 240	VK* [%]
EBNA-1	1,77	8,52	1,20	11,60	1,19	19,34
EA-D p54	1,24	7,49	1,11	14,32	1,24	14,50
VCA gp125	1,02	9,34	1,03	13,31	1,29	21,88
Durchführung	1 Bearbeiter, 48x Bestimmung, 1 Charge		2 Bearbeiter pro Tag, 2x Bestimmung, 20 Tage, 1 Charge		2 Bearbeiter pro Tag, 2x Bestimmung, 20 Tage, 3 Chargen	

Automatisierbarkeit

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität wurden manuell sowie mit dem Mikrotiterplatten-Prozessor DS2[®] (Dynex Technologies; manuelle Probenvorverdünnung) abgearbeitet. Aus den gemessenen Ratios der Spots wurde der Korrelationskoeffizient r^2 für ausgewählte Antikörperreaktivitäten zwischen den einzelnen Methoden der Durchführung ermittelt.

Ig-Isotyp-Nachweis	Dynex DS2 [®] vs. manuelle Abarbeitung	
	r^2 IgG [n = 141]	r^2 IgM [n = 168]
EBNA-1	0,96	./.
VCA p18	0,95	0,80
EA-D p54	0,86	0,86
VCA gp125	0,96	0,88

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *In-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer und TMB-Substratlösung. Diese sind Chargen- und Parameter-übergreifend verwendbar.

Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:







- **Nicht essen, trinken oder rauchen!**
- **Nie mit dem Mund pipettieren!**
- **Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!**
- **Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!**













Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2019-06-01	Allgemein	Neuerstellung

Inkubationsschema SeraSpot® Anti-EBV-4 IgG / Anti-EBV-3 IgM

-  100 µl
30 min
Verdünnte Probe (1 : 101)
Inkubation (Raumtemperatur)
 3 x Waschen
mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität
-  50 µl
30 min
Konjugat **CONJ HRP IgG** oder **CONJ HRP IgM**
Inkubation (Raumtemperatur)
 3 x Waschen
mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität
-  50 µl
30 min
Substratlösung **SUBSTR TMB**
Inkubation (lichtgeschützt bei Raumtemperatur)
 Absaugen
4. Bildaufnahme der Kavitäten und Imageanalyse
Scanner Seramun SpotSight® plate / Seramun SpotSight® strip und Software Seramun SpotSight® scan

	Hersteller		Herstellungsdatum		Verwendbar bis	LOT	Charge	REF	Artikelnummer
	Vor Sonnenlicht schützen		Temperaturbegrenzung		Biologische Risiken		Nicht wiederverwendbar		
	Gebrauchsanweisung beachten		Achtung	IVD	<i>In-vitro</i> - Diagnostikum		Ausreichend für <n> Prüfungen		

SeramunBlau®, SeraSpot® und Seramun SpotSight® sind eingetragene Marken der Seramun Diagnostica GmbH.

SeraSpot® Anti-EBV-4 IgG SeraSpot® Anti-EBV-3 IgM

Spotimmunoassay for detection of IgG or IgM antibodies to *Epstein-Barr-Virus* (EBV)
in human serum or plasma

REF SP-013-4 G-S6 ▽ 48	REF SP-013-4 G-S12 ▽ 96	REF SP-013-4 G-S24 ▽ 2x 96
	IVD <i>In-vitro</i> - diagnostic device	CE
REF SP-013-3 M-S6 ▽ 48	REF SP-013-3 M-S12 ▽ 96	REF SP-013-3 M-S24 ▽ 2x 96
	IVD <i>In-vitro</i> - diagnostic device	CE



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 33767 791-10 · fax +49 33767 791-99 · info@seramun.com

Introduction

The *Epstein-Barr-Virus* (EBV, also known as *Human gammaherpesvirus 4*) is a small, enveloped, double-stranded DNA virus in the family of *Herpesviridae*. The DNA contains internal and terminal repetitive sequences, whereby the terminal sequences enable a ring formation for the DNA replication.

The EBV is the aetiologic agent of the infectious mononucleosis (glandular fever). After a symptomatic or asymptomatic EBV infection the virus could establish a lifelong persistent infection. The virus is mainly transmitted through saliva (contact infection), a transmission through transplantations or blood transfusions is rare. At the age of 4, the infection rate is about 50%, from the age of 20 around 90% and from the age of 50 up to 99%.

An infection during childhood is often asymptomatic, but in case of young adults and adults the infection could lead in 30 to 60 % of all cases to the onset of an infectious mononucleosis. After an incubation time of 10 to 50 days (the average incubation time is 10 to 15 days) the first symptoms could occur. The common symptoms are fever, lymphadenopathy (lymphoma), hepatosplenomegaly (enlargement of the liver and spleen), pharyngitis (sore throat) and tonsillitis. More respiratory symptoms could be dominant in children. In immunocompetent persons the disease is self-limiting and last no longer than 3 weeks.

Especially EBV is associated in immunosuppressed patients with different lymphoproliferative diseases, such as the Burkitt's lymphoma (lymph node cancer) and nasopharyngeal carcinoma (nose and throat cancer).

During primary infection with EBV, the epithelial cells and B-lymphocytes in the oropharyngeal tract are infected. The virus is spread through the B-lymphocytes in the entire body. The infection could be lytic or latent.

The lytic infection is mainly in epithelial cells and leads to the lysis of the infected cells and the release of virus particles. During the lytic phase regulatory proteins, which belong to the group of "immediately early antigen" (IEA) and "early antigen" (EA), are synthesized to enable the production of the viral DNA,

structural components of the virion ("viral capsid antigen" (VCA)) and membrane proteins (MA). The gene products possess antigenic characteristics and initiate the formation of antibodies.

B-lymphocytes are usually latently infected. The viral genome is in the cell nucleus of the infected cell in an extrachromosomal form (episome). This leads to an immortalization of the B-cells and to the transformation of continuously growing blasts. In immunocompetent persons the growth of the transformed cells is controlled by cytotoxic T-lymphocytes and NK cells. Especially the CD8+ T-cells are directed against antigens of the lytic and latent phase. The immune response is insufficient to disrupt all infected cells. Therefore, the virus can persist in the organism.

During the latent phase, "EBV nuclear antigens" (EBNAs) and 3 latent membrane proteins (LMPs) are expressed in the infected cells. The EBNAs are a complex of at least 6 proteins (ENBA 1-6). EBNA-1 is responsible for the maintenance of the episomal status of the EBV-DNA.

The EBV reactivation, which could occur during the latent phase, is enabled through the recirculation of the infected B-cells in the lymphatic tissue, which are differentiated to plasma cells.

The humoral immune response includes antibodies against antigens of the lytic and latent phase:

Antibodies against EA showing 2 different patterns: a diffuse pattern (EA-D) and restricted pattern (EA-R). EA-D-specific IgG-antibodies are developed during the first 3-4 weeks and are undetectable after 3-4 months. Approximately 85% of the patients with an acute infection are positive for EA-D (up to 3 months after onset of symptoms). In some cases, the antibodies could be detectable over years after a primary infection. During an EBV reactivation (in immunosuppression) and in patients with a nasopharyngeal carcinoma high EA-D-specific antibody titer could be detected.

IgG antibodies against the capsid antigen VCA are developed with the first clinical symptoms of an acute infection and remain in the body throughout the life. IgM antibodies are developed at the same time as the IgG antibodies for VCA but disappear within a few weeks.

EBNA-1 IgG antibodies are not detectable during the first 3-4 weeks after onset of the symptoms and are therefore a marker for a past infection. However, 5% of the patients are not producing anti-EBNA-1. A negative Anti-ENBA-1 IgG result in combination with a positive VCA-IgG, could lead to a false positive diagnosis of an acute infection. In 7% of samples out of the laboratory routine, VCA IgG is isolated reactive. p18 (VCA) is another late marker, which is in contrast with EBNA-1 always produced.

Using 3 parameters (VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG) a differentiation between acute and past infection is in immunocompetent patients usually possible. In immunosuppressed patients is the interpretation of the antibody reactivities difficult. Due to a failure of the immune system and the fact that the production of the antibodies could differ (depending on the dynamic of the infection), atypical antibody patterns could occur.

In diagnostics commonly used screening tests are Immunofluorescence assays (IFAs), Enzyme Immunoassays (EIAs) and Chemiluminescence Immunoassays (CLIAs), which test for EA IgG, EBNA-1 IgG, VCA IgG and VCA IgM. In IFAs normally EBV-transformed B-cells from patients with Burkitt's lymphoma are used. In contrast to that, in EIAs and CLIAs purified, native or recombinant proteins, synthetic peptides or fusion proteins are used.

As confirmatory tests Immunoblot assays or Line-Immunoassays are applied, which are using viral lysates from EBV-transformed cells or recombinant antigens. Especially for the differentiation between acute and past infection (in the case, that VCA IgG is positive but EBNA-1 IgG and VCA IgM are negative) Immunoblot assays or Line-Immunoassays are well suitable.

Literatur:

50. Andersson, A., Vetter, V., Kreutzer, L., Bauer, G.: Avidities if IgG directed against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr virus serology, *J. Med. Virol.* 43: 238-244, 1994
51. Bauer, G.: Simplicity through complexity: Immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein-Barr virus serology, *Clin. Lab.* 47: 223-230, 2001
52. Bauer, G.: The rational basis for efficient Epstein-Barr virus (EBV) serology, *Clin. Lab.* 41: 623-634, 1995
53. Buisson, M., Fleurent, B., Mak, M., Morand, P., Chan, L., Ng, A., Guan, M., Chin, D., Seignerin, J. M.: Novel immunoblot assay using four recombinant antigens for diagnosis of Epstein-Barr virus primary infection and reactivation, *J. Clin. Microbiol.* 37(8): 2709-2714, 1999
54. Callan, M. F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G. S., Wilson, J. D., O'Callaghan, C. A., Steven, N., McMichael, A. J., Rickinson, A. B.: Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *In vivo*, *J. Exp. Med.* 187: 1395-1402, 1998

55. Coyle, P. V., Wyatt, D., Connolly, J. H., Lynch, G. A.: Antibodies to Epstein-Barr virus in patients with nasopharyngeal carcinoma in Northern Ireland, *Ir. J. Med.* 156: 182-184, 1987
56. De Paschale, M., Agrappi, C., Manco, M. T., Mirri, P., Viganò, E. F., Clerici, P.: Seroepidemiology of EBV and interpretation of the „isolated VCA IgG“ pattern, *J. Med. Virol.* 81: 325-331, 2009
57. De Paschale, M., Clerici, P.: Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions, *World J. Virol.* 1(1): 31-43, 2012
58. Evans, A. S., Niedermann, J. C., Cenabre, L. C., West, B., Richards, V. A.: A prospective evaluation of heterophile and EBV specific Ig; antibody tests in clinical and subclinical infectious mononucleosis, *J. Infect. Dis.* 132: 546-554, 1975
59. Fleisher, G., Henle, W., Henle, G., Lennette, E. T., Biggar, R. J.: Primary infection with Epstein-Barr virus in infants in the United States: clinical and serologic observations, *J. Infect. Dis.* 139: 553-558, 1975
60. Gärtner, B. C., Hess, R. D., Bandt, D., Kruse, A., Rethwilm, A., Römer, K., Müller-Lantzsch, N.: Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method, *Clin. Diagn. Immunol.* 10: 78-82, 2003
61. Gärtner, B. C., Kortmann, K., Schäfer, M., Müller-Lantzsch, N., Sester, U., Kaul, H., Pees, H.: No correlation in Epstein-Barr virus reactivation between serological parameters and viral load, *J. Clin. Microbiol.* 38: 2458, 2000
62. Gärtner, B. C., Müller-Lantzsch, N.: Epstein-Barr-Virus, *Mikrobiologische Diagnostik*, 2009
63. Gulley, M. L., Tang, W.: Laboratory assays for Epstein-Barr virus related disease, *J. Mol. Diagn.* 10: 279-292, 2008
64. Henle, G., Henle, W.: Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma, *J. Bacteriol.* 91: 1248-1256, 1966
65. Henle, W., Henle, G.: Epstein-Barr virus-specific serology in immunologically compromised individuals, *Cancer Res.* 41, 4222-4225, 1981
66. Henle, W., Henle, G., Andersson, J., Ernberg, I., Klein, G., Horwitz, C. A., Marklund, G., Rymo, L., Wellinder, C., Straus, S. E.: Antibody response to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 570-574, 1987
67. Hess, R. D.: Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years, *J. Clin. Microbiol.* 42(8): 3381-3387, 2004
68. Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D., Rickinson, A. B.: Cellular response to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus, *Annu. Rev. Immunol.* 25: 587-617, 2007
69. Holmes, R. D., Sokol, R. J.: Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr. Transplant.* 6: 456-464, 2002
70. Inoue, N. et al.: Use of enzyme-linked immunosorbent assays with chimeric fusion proteins to titrate antibodies against Epstein-Barr virus nuclear antigen 1, *Clin. Micro.* 30(6): 1442-1448, 1992
71. Jenson, H. B.: Virologic Diagnosis, Viral Monitoring, and Treatment of Epstein-Barr Virus Infectious Mononucleosis, *Curr. Infect. Dis. Rep.* 6: 200-207, 2004
72. Klemola, E., von Essen, R., Henle, G., Henle, W.: IM-like disease with negative heterophile agglutination test, *J. Infect. Dis.* 121: 608-614, 1970
73. Lamy, M. E., Favart, A. M., Cornu, C., Mendez, M., Segas, M., Burtonboy, G.: Study of Epstein-Barr virus (EBV) antibodies: IgG and IgM anti-VCA, IgG anti-EA and Ig anti-EBNA obtained with an original microtiter technique: -serological criteria of primary and recurrent EBV infections and follow-up of infectious mononucleosis—seroepidemiology of EBV in Belgium based on 5178 sera from patients, *Acta. Clin. Belg.* 37: 281-298, 1982
74. Leight, E. R., Sugden, B.: EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus, *Rev. Med. Virol.* 10: 83-100, 2000
75. Lennette, E. T., Henle, W.: Epstein-Barr virus infections: clinical and serological features, *Lab. Manage.* 25: 23-28, 1987
76. Linde, A.: Diagnosis and pathogenesis of infectious mononucleosis and other Epstein-Barr virus associated diseases, *Rev. Med. Microbiol.* 3: 43-51, 1992
77. Linde, A.: Diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases, *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 100: 83-88, 1996
78. Linde, A., Kallin, B., Dillner, J., Andersson, J., Jägdahl, L., Lindvall, A., Wahren, B.: Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays with two synthetic peptides of Epstein-Barr virus for infectious mononucleosis, *J. Infect. Dis.* 161: 903-909, 1990
79. Kampmann, M., Henninger, K., Bauer, G.: Determination of antibodies direct specifically against Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) by anticomplementary immunofluorescence (ACIF), *Med. Microbiol.* 2: 1-8, 1993
80. Niedobitek, G., Hamilton-Dutoit, S., Herbst, H., Finn, T., Vetner, M., Pallesen, G., Stein, H.: Identification of Epstein-Barr virus-infected cells in tonsils of acute infectious mononucleosis by *in situ* hybridization, *Hum. Pathol.* 20: 796-799, 1989
81. Nikoskelainen, J., Lelkola, J., Lelkola E.: IgM antibodies specific for EBV in IM without heterophile agglutination test, *Br. Med. J.* 4: 72-75, 1974
82. Nikoskelainen, J., Neel, E. U., Stevens, D. A.: Epstein-Barr virus-specific serum immunoglobulin A as an acute-phase antibody in infectious mononucleosis, *J. Clin. Microbiol.* 10: 75-79, 1979
83. Reedman, B. M., Klein, G.: Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines, *Int. J. Cancer.* 11: 499-520, 1973
84. Rickinson, A. B., Kieff, E.: Epstein-Barr virus, In: Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Martin, M. A., Lamb, R. A., Roizman, B., editors, *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins: 2575-2627, 2001

85. Schillinger, M., Kampmann, M., Henninger, K., Murray, G., Hanselmann, I., Bauer, G.: Variability of humoral immune response to acute Epstein-Barr virus (EBV) infection: evaluation of the significance of serological marker, *Med. Microbiol. Letters* 2: 296-303, 1993
86. Schmitz, H., Volz, D., Krainlek-Richert, C. H., Schere, M.: Acute EBV infections in Children, *Med. Microbiol. Immunol.* 158: 58-63; 1972
87. Schubert, J., Zens, W., Weissbrich, B.: Comparative evaluation of the use of immunoblots and of IgG avidity assays as confirmatory tests for the diagnosis of acute EBV infections, *J. Clin. Virol. Methods* 11: 161-172, 1998
88. Straus, S. E., Cohen, J. I., Tosato, G., Meier, J., NIH conference: Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management, *Ann. Intern. Med.* 118: 45-58, 1993
89. Svahn, A., Magnusson, M., Jägdahl, L., Schloss, L., Kahlmeter, G., Linde, A.: Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays and two latex agglutination assays for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection, *J. Clin. Microbiol.* 35: 2728-2832, 1997
90. Sumya, C. V., Ench, Y.: Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children, II, Heterophil antibody and viral-specific responses, *Paediatrics.* 75:1011-1019, 1985
91. Thorley-Lawson, D. A.: Epstein-Barr virus: exploiting the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 1: 75-82, 2001
92. Tierney, R. J., Steven, N., Young, L. S., Rickinson, A. B.: Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state, *J. Virol.* 68: 7374-7385, 1994
93. Yao, Q. Y., Rickinson, A. B., Epstein, M. A.: A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals, *Int. J. Cancer* 35: 35-42, 1985
94. Van Gunsven, W. M. J., A. Nabbe, and J.M. Middeldorp: Identification and molecular characterization of two diagnostically relevant marker proteins of the Epstein-Barr virus capsid antigen, *J. Med. Virol.* 40:161-169, 1993
95. Van Grunsven, W. M. J., W. J. M. Spaan, and Middeldorp: Localization and diagnostic application of immunodominant domains of the BFRF3-encoded Epstein-Barr virus capsid protein, *J. Infect. Dis.* 170:13-19, 1994
96. Tranchand-Bunel, D., C. Auriault, E. Diesis, and H. Gras-Masse: Detection of human antibodies using "convergent" combinatorial peptide libraries or "mixotopes" designed from non-variable antigen: application to the EBV viral capsid antigen p18, *J. Pept. Res.* 52:495-508, 1998
97. Tranchand-Bunel, D., H. Gras-Masse, B. Bourez, L. Dedecker, and C. Auriault: Evaluation of an Epstein-Barr Virus (EBV) Immunoglobulin M Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using a Synthetic Convergent Peptide Library, or Mixotope, for Diagnosis of Primary EBV Infection, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1), 2366-2368, 1999

Intended use

The *SeraSpot*[®] Anti-EBV-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-EBV-3 IgM test is an *in vitro* diagnostic device (spotimmunoassay, SIA) for the detection of EBV-specific IgG or IgM antibodies in human serum or plasma samples.

Principle of the test

The *SeraSpot*[®] Anti-EBV-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-EBV-3 IgM test is a solid phase immunoassay based on the use of recombinant EBV antigens as capture antigens printed in array arrangement (spot array) on the bottom of the wells of 96well-microtiter plates. The recombinant antigens serve as capture molecules for antibodies against EBV antigens. Bound antibodies are detected by horseradish peroxidase-(HRP)-labeled antibodies against human antibodies of IgG- or IgM-type by substrate reaction with hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). At the site of formed immune complexes blue spots are developed by precipitated product from colorless substrate solution. Color intensity correlates to the antibody concentration. Pale blue to dark blue spots are visible by eye.

The test procedure for antibody detection is performed in 3 steps:

Step 1

Incubation of 1 : 101 diluted samples for 30 minutes at room temperature in the intended wells. After incubation samples are aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash solution.

Step 2

Incubation of wells with the anti-human IgG- or IgM-HRP-conjugate for 30 minutes at room temperature. After incubation the antibody is sucked off and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash solution.

Step 3

Incubation of wells with substrate solution SeramunBlau[®] spot dark for 30 minutes at room temperature. The reaction is stopped by sucking off the substrate solution, followed by tapping the plate/strip dry onto lint-free absorbent paper. The coloring of the developed arrays is stable when stored protected from light.

After finishing step 3, developed assays can be scanned within 24 hours either by using the Seramun *SpotSight*[®] plate or Seramun *SpotSight*[®] strip scanner; the obtained images are interpreted by using the Software Seramun *SpotSight*[®] scan. Taking account of the test-specific evaluation criteria, the test result is determined.

Used EBV antigens

Nomenclature	Properties	Relevance	Origin
EBNA-1	Epstein-Barr Nuclear Antigen-1	EBNA-1-specific IgG antibodies are specific marker for a past EBV infection. In some patients the EBNA-1-specific IgG antibody titer could be decreased (secondary EBNA-1 loss).	recombinant
VCA p18	Virus Capsid Antigen, p18	VCA p18-specific IgM and IgG antibodies are specific marker for a EBV infection. IgM antibodies are early detectable, later declining and replaced by the IgG antibody response. VCA p18-specific IgG antibodies are persistent and detectable lifelong.	recombinant
EA-D p54	Early Antigen-Diffuse, p54	EA-D is described as an early antigen. It is involved in the replication of the viral DNA. EA-D-specific antibodies could occur during primary infection. EA-D antibodies are often detected in patients with nasopharyngeal carcinoma.	recombinant
VCA gp125	Virus Capsid Antigen, Glycoprotein125	The glycoprotein 125 is one of the "virus capsid antigens". The proteins gp125 and p18 are immunodominant. VCA gp125-specific IgM antibodies are often produced very early during a primary infection. VCA gp125-specific IgG antibodies are persistent and detectable lifelong.	recombinant

Kit components

		For 48 determinations	For 96 determinations	For 2x 96 determinations	
1	WELLS	Wells with arrays	6 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	12 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	2x 12- single breakable 8-well strips in frame separately vacuum-sealed with desiccant
IgG detection: color coding red; IgM detection: color coding orange					
2	WASHBUF CONC 10X	Wash buffer Seramun® Wash buffer A	100 ml concentrate transparent bottle, white cup	100 ml concentrate transparent bottle, white cup	2x 100 ml concentrate transparent bottle white cup
3	DIL	Sample diluent Seramun® Sample diluent B	55 ml ready-to-use solution, colored red transparent bottle black cup	2x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cup	4x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cup
4	CONJ HRP IgG	Anti-human IgG-HRP-conjugate	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cup	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cup	2x 8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cup
	CONJ HRP IgM	Anti-human IgM-HRP-conjugate	8 ml ready-to-use solution, colored green, transparent bottle, green cup	8 ml ready-to-use solution, colored green, transparent bottle, green cup	2x 8 ml ready-to-use solution, colored green, transparent bottle, green cup
5	SUBSTR TMB	Substrate SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cup	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cup	2x 8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cup
6	COVER	Adhesive film	2x	2x	4x
7	SWAB	Swab with 70 % (v/v) Isopropyl alcohol	3x 2	6x 2	12x 2

Preparation and storage of samples

Sample collection should be done in a sterile manner. Serum is separated after clotting by centrifugation as soon as possible. Samples can be stored at 2...8 °C for a maximum of 48 hours. For longer storage times samples have to be stored at -20 °C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided!

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. The samples have to be diluted 1 : 101 (10 µl sample and 1000 µl sample dilution buffer) with the ready to use sample diluent.

Materials required but not provided

- Adjustable single-channel micro-pipettes incl. pipette tips
- Adjustable multi-channel micro-pipettes incl. pipette tips
- Reagent container for multi-channel micro-pipettes
- Distilled or deionized water
- lint-free absorbent paper
- Test tubes (1 ml) for sample dilution
- Beaker and measuring cylinder
- stop watch
- Washer for 96-well microtiter plates (optional)
- Collecting devices for infectious material
- Seramun *SpotSight*® plate or Seramun *SpotSight*® strip scanner with evaluation software Seramun *SpotSight*® scan

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 1x 48, 1x 96 or 2x 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label; that of the complete kit on the outer box label. Upon receipt, all test components have to be kept at 2...8 °C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 3 months, provided proper storage. The ready-to-use wash solution can be used up to 4 weeks when stored at 2...8 °C and up to 2 weeks when stored at room temperature.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed. Prepare a sufficient amount of wash buffer by diluting one part of the wash buffer concentrate **WASHBUF CONC 10X** with 9 parts of distilled or de-ionized water. For Example: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml distilled water. The substrate **SUBSTR TMB** must be protected from direct light! The test should not be performed with a substrate solution **SUBSTR TMB** that is colored dark or contains colored precipitates!

Workplace requirements

Processing the spotimmunoassays requires a clean and lint-free workplace. Adhesion of fibers to the plastic surface of the wells has to be avoided. Fibers may disturb optical image generation of arrays and cause erroneous results. Workplace and kit components should not be exposed to direct sunlight.

Assay procedure

Performance at room temperature (18...25 ° C) and at the specified incubation times.

For the handling of *SeraSpot*[®] tests the use of the starter kit (order number: SP-000-1) is recommended. The kit is designed for multiple use.

Important notes:

- **Avoid any contact or scratching on the bottom surface of the wells by pipet tips or washer needles. This results in irreparable damages of the spot array.**
- **All liquid reagents (sample, conjugate and substrate) have to be pipetted without causing air bubbles into the wells.**
- **Before starting imaging of the wells it is necessary to remove particles or fibers which may adhere to the underside of the bottom of the wells using the swab **[SWAB]** provided in the kit.**
- **Due to the drying of residual liquid, the images may appear more contrast-intensive, which can lead to slight deviations of the measured values during repeated scanning. Evaluation of the individual parameters is not changed!**

Working steps

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Add **100 µl** of 1:101 diluted sample to each well. Preparation of working dilution of the sample e.g. 10 µl serum and 1000 µl sample dilution buffer.
3. Cover plate with adhesive film **[COVER]** and incubate for **30 min** at room temperature.
4. Empty wells (**aspirate and discard** samples), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **[WASHBUF CONC 10X]**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
5. Add **50 µl** of the ready-to-use conjugate solution **[CONJ HRP IgG]** or **[CONJ HRP IgM]** to each well.
6. Cover plate with adhesive film **[COVER]** and incubate for **30 min** at room temperature.
7. Empty wells (**aspirate and discard** samples), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **[WASHBUF CONC 10X]**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
8. Add **50 µl** of the ready-to-use substrate solution **[SUBSTR TMB]** to each well.
9. Cover plate and protect from light. Incubate for **30 min** at room temperature.
10. Empty wells (**aspirate and discard** substrate). Tap plate dry onto lint-free absorbent.
11. Clean bottom of wells with Swab **[SWAB]**.
12. Perform image acquisition using the Seramun *SpotSight*[®] plate or the Seramun *SpotSight*[®] strip scanner and evaluate the results with the Seramun *SpotSight*[®] scan software. If image acquisition is performed with the scanner Seramun *SpotSight*[®] strip, transfer single 8-well microtiter plate strips to the scanners strip holder.

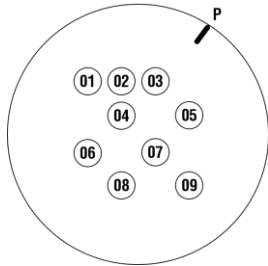
Aspiration and washing steps can be performed manually or via washer for 96-well microtiter plates.

After aspiration of the substrate solution, the color of developed spots is stable for 24 hours when the plate is stored in the dark.

Test evaluation

Arraylayout IgG detection

SP-013-4 G



Parameter

04	EBNA-1
05	VCA p18
06	EA-D p54
07	VCA gp125

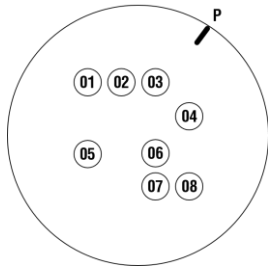
Kontrollen

01	Positive control (PC)
02	Cut-off control (CO)
03	Negative control (NC)
08	IgG conjugate control (GC)
09	Serum control (SC)

P Well position marker

Arraylayout IgM detection

SP-013-3 M



Parameter

04	VCA p18
05	EA-D p54
06	VCA gp125

Kontrollen

01	Positive control (PC)
02	Cut-off control (CO)
03	Negative control (NC)
07	IgM conjugate control (MC)
08	Serum control (SC)

P Well position marker

Validity criteria for the test

The *SeraSpot*[®] Anti-EBV-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-EBV-3 IgM test includes the following control spots:

1. Positive control (PC). Intensively stained spot, darker than cut-off control. Always stained.
2. Cut-off control (CO). Weakly stained spot. Used for result evaluation of parameter specific signals.
3. Negative control (NC). Pale spot with intensity lower than cut-off control
4. IgG, IgM conjugate control (GC, MC). Intensively stained spots with different position for IgG and IgM antibody detection. Serving as antibody isotype control.
5. Serum control (SC). Intensively stained spot always stained in presence of sample. Absence of spot indicates absence of sample.

The test cannot be evaluated if one of the validity criteria listed in points 1 to 5 is not fulfilled.

Result interpretation

Evaluation of the test has to be performed by using the *Seramun SpotSight*[®] scan software. A visual plausibility check is possible with the aid of the magnifying lens contained in the starter kit (order number: SP-000-1).

Judgment of spot staining is performed according to the following classification:

Result Interpretation	IgG	IgM
negative	no antigen spot > Cut-off control	no antigen spot > Cut-off control or EA-D p54 > Cut-off control
positive	one or more antigen spots > Cut-off control	one or more antigen spots (except EA-D p54 isolated positive) > Cut-off control

Suggested interpretation of the test results.

Category	IgG	IgM	Interpretation
1	EBNA-1 negative	positive	Indication of an acute or primary EBV infection.
2	EBNA-1 positive	negative	Indication of a past EBV infection.
3	EBNA-1 negative and VCA p18 + VCA gp125 positive	negative	Indication of a past EBV infection.
4	negative	negative	No antibodies against EBV antigens are detectable.
5	all other reactivities*	all other reactivities*	Results not clear (control recommended).

*During EBV reactivation different antibody reactivities could occur. The EBV reactivation cannot be diagnosed with a specific antibody reactivity profile.

Limitations of the procedure

The final result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks. Impurities and cross contamination of reagents or samples by fungi or bacteria can lead to false positive as well as false negative results.

Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples (concentrations up to 500 mg/dl hemoglobin, 1000 mg/dl lipids and 20 mg/dl bilirubin C / bilirubin F) and rheumatoid factors (500 IU/ml) do not interfere with the test.

Assay procedure

Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the wells or incorrect timing can produce erroneous results.

Air bubbles generated by too forceful pipetting of samples and/or reagents cause uneven signal formation of arrays. These arrays cannot be used for evaluation.

Damaged arrays e.g. by scratching the well bottom with pipet tips or washer needles are not suitable for evaluation.

Any kind of fibers which may adhere to the underside of the bottom of the wells or to the array area cause erroneous results.

Performance characteristics

Diagnostic sensitivity and specificity

Serologically pre-determined samples (reference test 1) were tested in the *SeraSpot*[®] Anti-EBV-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-EBV-3 IgM test (“Initial sensitivity” / “Initial specificity”). Samples with discrepant results were retested in a second assay for detection of EBV antibodies. The results obtained in the reference test 2 were used for determination of the final status of the samples with discrepant results (“Amended sensitivity” / “Amended specificity”).

IgG	n = 130	Reference test 1	
		positive (n = 84)	negative (n = 46)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-EBV-4 IgG	positive	82	2
	negative	2	44

Initial sensitivity: **97.6 %**

Amended sensitivity: **97.7 %**

Initial specificity: **95.7 %**

Amended specificity: **97.8 %**

IgM	n = 132	Reference test 1	
		positive (n = 22)	negative (n = 110)
<i>SeraSpot</i> [®] Anti-EBV-3 IgM	positive	20	3
	negative	2	107

Initial sensitivity: **90.9 %**

Amended sensitivity: **92.0 %**

Initial specificity: **97.3 %**

Amended specificity: **100 %**

Precision

Samples of known antibody titer were assayed by *SeraSpot*[®] Anti-EBV-4 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-EBV-3 IgM test. Color intensity of antigen spots divided by the color intensity of the Cut-off control (Ratio) was recorded and the coefficients of variation (CV) were calculated.

IgG detection						
	Intra-assay CV		Inter-assay CV		Interbatch CV	
	Ratio [\bar{x}] n = 48	CV [%]	Ratio [\bar{x}] n = 80	CV [%]	Ratio [\bar{x}] n = 240	CV [%]
EBNA-1	1.23	8.94	1.30	9.27	1.39	11.58
VCA p18	1.83	8.16	1.63	12.98	1.63	14.61
EA-D p54	1.56	9.03	1.24	19.18	1.10	24.20
VCA gp125	1.04	8.71	1.34	16.92	1.28	18.86
Procedure	1 operator, 48x determination, 1 batch		2 operator, 2x determination, 2x testing per day, 20 days, 1 batch		2 operator, 2x determination, 2x testing per day, 20 days, 3 batches	

IgM detection						
	Intra-assay CV		Inter-assay CV		Interbatch CV	
	Ratio [\bar{x}] n = 48	CV [%]	Ratio [\bar{x}] n = 80	CV [%]	Ratio [\bar{x}] n = 240	CV [%]
EBNA-1	1.77	8.52	1.20	11.60	1.19	19.34
EA-D p54	1.24	7.49	1.11	14.32	1.24	14.50
VCA gp125	1.02	9.34	1.03	13.31	1.29	21.88
Procedure	1 operator, 48x determination, 1 batch		2 operator, 2x determination, 2x testing per day, 20 days, 1 batch		2 operator, 2x determination, 2x testing per day, 20 days, 3 batches	

Automation

Samples of known antibody titer were assayed manually or by use of the microplate processors DS2[®] (Dynex Technologies; manual sample dilution). Color intensity of antigen spots divided by the color intensity of the Cut-off spot (Ratio) was recorded and used for calculation of the coefficient of determination r^2 for selected antibody reactivities and the different methods of operation.

Ig-isotype detection	Dynex DS2 [®] vs. manual processing	
	r^2 IgG [n = 141]	r^2 IgM [n = 168]
EBNA-1	0.96	./.
VCA p18	0.95	0.80
EA-D p54	0.86	0.86
VCA gp125	0.96	0.88

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instruction carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. The test instructions have to be followed strictly. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. Do not use reagents from damaged packages or bottles.

Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, washing buffer and TMB substrate solution. These can be used across batches and parameters.

Do not use reagents from other manufacturers to complete the kit. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact immediately remove by rinsing with water. All reagents should be stored at 2...8 °C. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

In particular the following precautions should be observed:







- **Do not smoke, eat or drink while handling kit material!**
- **Never pipette by mouth!**
- **Always use protective gloves!**
- **Note safety precautions of the single test components!**













History of changes

Version	Section	Modifications
2019-06-01	-	Initial release

Incubation scheme SeraSpot® Anti-EBV-4 IgG / Anti-EBV-3 IgM

-  100 µl diluted sample (1 : 101)
30 min incubation (room temperature)
 3 x wash with washing solution, each 400 µl per well
-  50 µl conjugate **CONJ HRP IgG** or **CONJ HRP IgM**
30 min incubation (room temperature)
 3 x wash with washing solution, each 400 µl per well
-  50 µl substrate **SUBSTR TMB**
30 min incubation (room temperature, protected from light)
 aspiration
4. imaging of wells and image analysis scanner Seramun SpotSight® plate / Seramun SpotSight® strip and software Seramun SpotSight® scan

 Manufacturer	 Date of manufacture	 Use by	LOT Batch code	REF Catalog number
 Keep away from sunlight	 Temperature limits	 Biological risks	 Do not reuse	
 Consult instructions for use	 Caution	IVD <i>In-vitro</i> -diagnostic medical device	 Contains sufficient for <n> tests	

SeramunBlau®, SeraSpot® und Seramun SpotSight® are registered trademarks of Seramun Diagnostica GmbH.