

# ImmunoDOT™ EBV MONO - G

REF GB 6085



Détection qualitative des anticorps anti-VCA et anti-EBNA d'isotype IgG présents lors d'infection EBV dans le sérum humain.

## DÉFINITION

Le Test **ImmunoDOT™ EBV MONO G** est un test immunoenzymatique (EIA) permettant une détection rapide et qualitative des anticorps anti-VCA IgG, anti-EBNA IgG dans le sérum humain. Ce test est destiné au sérodiagnostic d'une infection passée ou ancienne à EBV. Le test peut être utilisé avec **ImmunoDOT™ EBV MONO M** lors du diagnostic sérologique de la mononucléose infectieuse à EBV.

## RÉSUMÉ ET EXPLICATIONS

La mononucléose infectieuse (MNI) due au Virus d'Epstein Barr (EBV), est un syndrome lymphoprolifératif transitoire, aigu, fébrile, d'évolution bénigne. C'est une infection très largement répandue infectant plus de 95% des individus adultes.

La transmission interhumaine se fait le plus souvent par la salive ; elle est d'autant plus précoce que les conditions sanitaires sont défavorables. Après pénétration dans l'oropharynx, le virus se multiplie in situ, les lymphocytes B s'infectant secondairement lors du passage dans le tissu lymphoïde pharyngé. La transmission vénérienne semble possible.

L'infection par l'EBV peut se traduire par :

- une séroconversion asymptomatique ;
- un syndrome mononucléosique modéré avec fièvre légère, angine, adénopathies surtout chez les jeunes enfants ;
- une mononucléose infectieuse (MNI) avec angine, adénopathies, asthénie, sensibilisation à certains antibiotiques (Ampicilline) surtout chez les adolescents ;
- un syndrome mononucléosique avec fatigue chronique ;
- des pathologies parfois malignes liées à la persistance du virus dans l'organisme comme les lymphomes du sujet immunodéprimé, le carcinome indifférencié du nasopharynx, la leucoplasie orale chevelue, le lymphome de Burkitt.

Les anticorps dirigés contre les différents antigènes de l'EBV, apparaissent au cours de la primo-infection selon une cinétique bien déterminée.

Les anticorps anti-VCA IgG et IgM sont dirigés contre des antigènes de capsid. Les anticorps anti-VCA IgM n'apparaissent qu'au cours d'une infection aiguë ou rarement d'une réactivation et disparaissent en 4 à 8 semaines. Les anticorps anti-VCA IgG, apparaissent dans toutes les primo-infections à EBV. Après infection, ces anticorps diminuent et persistent toute la vie.

Les anticorps anti-EBNA IgG sont dirigés contre les antigènes nucléaires. Ces anticorps apparaissent tardivement après toutes les infections à EBV. Ils sont toujours absents lors de la phase aiguë de la primo-infection.

Le test **ImmunoDOT™ EBV MONO G** permet la détection spécifique des anticorps anti-VCA-IgG, des anticorps anti-EBNA IgG qui peuvent apparaître au cours ou à la fin de l'infection EBV.

Le diagnostic sérologique de l'infection à EBV est assuré par la détection conjointe des anticorps IgM et IgG (EBNA IgG, VCA IgG, VCA IgM).

Les contrôles CMV et toxoplasma gondii n'ont pas été validés. Ne pas tenir compte des résultats obtenus pour ces deux paramètres. La recherche des anticorps IgG anti-CMV et anti-Toxoplasma devra être faite par des tests sérologiques validés.

## PRINCIPE DU TEST

Le test **ImmunoDOT™ EBV MONO G** utilise une technique EIA DOT BLOT pour la détection des anticorps anti-VCA IgG et des anticorps anti-EBNA IgG. Les différents antigènes sont déposés dans des puits séparés, le tout sur une membrane.

Après avoir déposé l'échantillon dans la cuve de réaction, la bandelette est introduite, pour laisser les anticorps du patient se fixer sur la membrane.

Dans un deuxième temps, après élimination des fixations non spécifiques, la réaction est amplifiée.

Pendant le troisième temps, le conjugué à la phosphatase alcaline anti-immunoglobulines humaines isotype IgG, est ajouté pour se fixer aux anticorps déjà fixés du patient.

Finalement, la bande est transférée dans un substrat enzymatique qui va réagir avec la phosphatase alcaline pour former des cercles distincts et bien visibles.

## CONDITIONS DE CONSERVATION

- Conserver les réactifs et les bandelettes entre +2°C et +8°C.
- Les réactifs doivent être amenés à température ambiante (entre +15°C et + 30°C) avant utilisation. Ils doivent être utilisés dans l'heure qui suit leur mise en place dans le poste de travail chauffé.
- Eviter la contamination des réactifs, qui peut produire des résultats erronés.

## MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Station de travail (incubateur)
- Système de prélèvement d'échantillons
- Chronomètre
- Eau distillée ou déionisée pour analyses, utilisée comme clarifiant
- Pipettes
- Papier absorbant pour essuyer les bandes de test

## ÉCHANTILLONS

- Le test **ImmunoDOT™ EBV MONO-G** nécessite 10µl de sérum.
- Eviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou lactescents car ils ne sont pas compatibles avec la technique.
- Recueillir les échantillons de sérum en respectant l'asepsie et les conserver entre +2°C et +8°C pendant 48 heures au maximum.
- Si le dosage est prévu dans un délai plus long, conserver les prélèvements à -20°C.

## COMPOSITION DU COFFRET

Bandelettes <b>ImmunoDOT™ EBV MONO G</b>	50
<p><b>STRIP</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>⊕ Contrôle positif</li> <li>⊕ Antigène EBV-VCA purifié<sup>(*)</sup> et antigène recombiné (BFRF3)</li> <li>⊕ Antigène EBV-EBNA recombinant (B95-8)</li> <li>⊖ Contrôle antigène CMV (AD169) Non validé</li> <li>⊖ Contrôle antigène Toxoplasma gondii (RH-1) Non validé</li> <li>⊖ Contrôle négatif</li> </ul> <p>(*) partiellement purifié à partir d'EBV de souche P3HR1</p>	
<b>Diluant</b> <span style="float: right;">DIL   SPE</span> <i>composé d'un tampon (pH 6,2-7,6), de protéines stabilisantes et d'azide de Sodium &lt;0,1% comme agent conservateur.</i>	2 x 50ml
<b>Activateur</b> <span style="float: right;">SOLN   ENH</span> <i>composé de chlorure de sodium et d'azide de Sodium &lt; 0,1%.</i>	2 x 50ml
<b>Conjugué</b> <span style="float: right;">CONJ   IgG</span> <i>composé d'anticorps de chèvre anti-IgG humain conjugués à la phosphatase alcaline dans un tampon (pH 6,2-7,6) et associé à des protéines stabilisantes.</i>	2 x 50ml
<b>Révéléateur</b> <span style="float: right;">SUBS   BCIP-NBT</span> <i>[substrat] composé de phosphate de 5-bromo-4-chloro-3-indolyde et de chlorure de p-nitro tétrazolium bleu dans un tampon (pH 8,0-11,0), 0,8 % de diméthylformamide et d'azide de Sodium &lt; 0,1%.</i>	2 x 50ml
<b>Contrôle positif</b> <span style="float: right;">CONTROL   +</span>	1 x 100µl
<b>Cuves de réactions</b>	200
<b>Notice technique</b>	1

## PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Les réactifs du Test **ImmunoDOT™ EBV MONO G** ont été choisis de façon à former un système optimal. Ne pas les remplacer par d'autres réactifs ou d'autres systèmes d'analyse ImmunoDOT.

La dilution ou la modification de ces réactifs peut également modifier les performances du test.

Ne pas utiliser les coffrets après la date de péremption.

Utiliser de l'eau distillée ou déionisée en bouteille comme clarifiant.

Il faut observer strictement les procédures du test pour obtenir des résultats optimaux. Ne pas raccourcir ni prolonger les temps d'incubation indiqués, sous peine d'obtenir de mauvais résultats.

Certains composants du coffret contiennent de l'azide de sodium, qui peut réagir dans les canalisations de plomb et de cuivre pour former des azides de métal très explosifs. Lors de l'élimination de ces composants, rincer avec un grand volume d'eau pour empêcher l'accumulation de l'azide.

Les produits d'origine humaine ont subi un dépistage négatif, concernant les anticorps anti-VIH 1 et 2, HTLV-1, les anticorps anti-VHC et l'antigène Hbs. Toutefois, s'agissant de produits potentiellement infectieux, il est nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.

## PRÉPARATION DU TEST

1. Allumer la station de travail et régler la température en fonction des instructions d'utilisation de l'appareil.

2. Sortir 4 cuves de réaction et les introduire dans les emplacements appropriés de la station de travail.

*Pour la station de travail (grand format) :* ajouter de l'eau distillée jusqu'à la ligne de remplissage du réservoir de clarifiant prévu.

*Pour la station de travail (petit format) :* utiliser un récipient adéquat et suffisamment d'eau distillée pour couvrir toutes les fenêtres de réaction de la membrane.

3. Identifier une bandelette pour chaque échantillon.

4. Placer :

- 2 ml de diluant (n° 1) dans la cuve de réaction n° 1
- 2 ml d'activateur (n° 2) dans la cuve de réaction n° 2
- 2 ml de conjugué (n° 3) dans la cuve de réaction n° 3

5. Laisser incuber 10 minutes.

6. Vérifier que la température du bloc chauffant soit conforme aux instructions du manuel d'utilisation propre au modèle de la station de travail.

7. Immerger la bandelette dans le bain d'eau distillée pendant 30 secondes, juste avant de commencer le protocole opératoire. Eviter la formation de bulles d'air.

## MODE OPÉRATOIRE

### 1. INCUBATION DES SERUMS

- Ajouter 10 µl de sérum échantillon ou de contrôle positif dans la cuve 1.
- Plonger la bandelette dans la cuve 1.
- Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.
- **Laisser incuber 60 mn.**

### 2. LAVAGE

- Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite durant 10 secondes de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.
- Eliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant.

### 3. ACTIVATEUR

- Placer la bandelette dans la cuve 2.
- Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.
- **Laisser incuber 5 mn.**

### 4. LAVAGE

- Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite durant 10 secondes de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.
- Eliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant.

### 5. CONJUGUE

- Placer la bandelette dans la cuve 3.
- Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.
- **Laisser incuber 30 mn.**
- **Au début de cette incubation, verser 2 ml de réactif 4 dans la cuve N°4.**

### 6. LAVAGE

- Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite durant 10 secondes de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.
- Immerger la bandelette dans le clarifiant (eau distillée).
- **Laisser tremper 5 mn sans agiter.**
- Eliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant.

## 7. REVELATEUR

- Placer la bandelette dans la cuve 4.
- Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.
- **Laisser incubé 5 mn.**

## 8. LAVAGE

- Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite **durant 10 secondes** de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.

## 9. SECHAGE

- Eliminer l'eau résiduelle avec un papier absorbant, et **laisser sécher pendant 5 min avant d'interpréter le résultat**. Les bandelettes doivent être parfaitement sèches avant d'être lues. **Un faux positif peut apparaître si la bandelette n'est pas complètement sèche.**

## 10. LECTURE DE LA BANDE D'ANALYSE

**Positif** : Un cercle avec une limite distincte et **FACILEMENT VISIBLE** apparaît au centre de la fenêtre. Le périmètre extérieur de la fenêtre doit être blanc à gris pâle.

**Négatif** : S'il n'y a pas de cercle ou un cercle difficile à voir, l'analyse doit être considérée comme négative.

Chaque fenêtre doit être lue indépendamment.

## CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les puits de contrôles positif et négatif doivent avoir correctement réagi sinon recommencer le test.

L'intensité de coloration du puits contrôle positif ne doit pas être considérée comme un étalon. Les réactions positives des puits contenant des antigènes seront plus ou moins foncées, en fonction de leur concentration en anticorps, que le contrôle positif de la bandelette.

Le **sérum de contrôle positif**, inclus dans les coffrets, est modérément positif pour tous les anticorps. Les performances de chaque kit peuvent être confirmées à la réception par une analyse de détermination utilisant ce sérum de contrôle, qui doit donner un résultat positif.

L'analyse est réalisée avec des réactifs chauffés à **+44°C-+48°C**. La température de la station de travail doit dépasser la température d'analyse dans la cuve de réaction. La température de la station de travail doit être surveillée.

## LIMITES DU TEST

- ⇒ Ce test constitue une procédure qualitative de dépistage et il ne peut pas être utilisé pour détecter les variations de titres d'anticorps.
- ⇒ Chez l'enfant de moins d'un an, les anticorps maternels seront principalement détectés.
- ⇒ Des sérums hyperlipémiques, hémolysés ou contaminés par des bactéries peuvent entraîner des résultats erronés.
- ⇒ Le test **ImmunoDOT™ EBV MONO G** utilisé seul ne permet en aucun cas de faire un diagnostic complet d'une mononucléose infectieuse due au virus d'Epstein Barr.
- ⇒ Le profil sérologique complet d'une infection à EBV doit comprendre les anticorps dirigés contre les différents antigènes EBV apparaissant au cours de l'infection : EBV VCA IgM, EBV VCA IgG et EBV EBNA IgG.
- ⇒ Si l'on veut apprécier un état de réactivation chez un immunodéprimé ou montrer que l'EBV est associé à une maladie maligne, le titrage des anticorps et la recherche des anti-EA (early antigen) est indispensable.
- ⇒ **Les contrôles CMV et toxoplasma gondii n'ont pas été validés. Ne pas tenir compte des résultats obtenus pour ces deux paramètres. La recherche des anticorps IgG anti-CMV et anti-Toxoplasma devra être faite par des tests sérologiques validés.**

⇒ L'interprétation des résultats du test **ImmunoDOT™ EBV MONO G** se fera en parallèle avec le test **ImmunoDOT™ EBV MONO M** technique permettant de détecter les anticorps anti-VCA isotype IgM.

## BIBLIOGRAPHIE

Centres for Disease Control/National Institutes of Health Manual Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (1999).

Lennette, ET, Manual of Clinical Microbiology, 4 th Ed.(Lennette, Balows, Housler, and Shadomy, eds) pp 728, ASM Press, Washington DC (1985).

Evans, AS, Medical Virology VII (de la Maza and Peterson, eds) pp 57, Elsevier New-York, NY (1988).

Naraqui,S, Textbook of Human Virology (Belshe,ed), pp 892, PSG Publishing Littleton, MA (1984).

Perham TGM,EO Caul, RJ Conway,et al, Brit.J.Haematol 20:307 (1971).

Kane, RC, WE Rousseau, GR Noble, et al.,Infect Immun 11:719 (1975).

Klemola, D,R. Von Essen, J. Paloheimo, et al., Scand.J. Infect.Dis 1:137 (1969).

McCabe RE and JS Remington, Principles and Practice of Infectious Diseases (Mandel, Douglas and Bennett, eds) pp 1542, John Wiley and Sons, New -York NY (1985).

J-M Seigneurin, Infections à virus Epstein-Barr. Encyclopédie Médico-Chirurgicale (Paris)

J-M.Seigneurin et M.Buisson, Sérologie du virus d'Epstein-Barr : aspects pratiques et interprétation des résultats. Feuilles de Biologie, 1990 -Vol.XXXI-N°174.

F.Denis, S.Ranger-Rogez et A. Vovor. L'Eurobiologiste 1994, tome XXVIII, n° 209 p.47-60

Lennette EH, Lennette DA, and Lennette ET. Epstein-Barr Virus, in Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections ( 7 th Ed ), Chapter 18, American Public Health Association, Washington DC, Lennette, ET, 1995.

## INDEX DES SYMBOLES



Déclaration de conformité CE



Test rapide



Dispositif de Diagnostic *In Vitro*



Référence Catalogue



Numéro de Lot



Date d'expiration



Nombre de tests



Consulter les instructions d'utilisation



Limites de température



Risque biologique



Contient de l'azide de sodium



A reconstituer

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Lecture et interprétation pour le puits VCA et EBNA. Le coffret **ImmunoDOT™ EBV MONO G** est un test pour la détection rapide et qualitative des anticorps EBV VCA IgG et EBV EBNA IgG.

ImmunoDOT™ MONO M		ImmunoDOT™ MONO G		Signes cliniques ou hématologiques	INTERPRÉTATION Stade de l'infection EBV	Fréquence du profil	REMARQUES
ACs* MNI**	VCA IgM	EBNA IgG	VCA IgG				
-	-	-	-	• absents	<b>sujet séronégatif (non infecté)</b>	adulte : rare enfant : fréquent	
-/+	+	-	-	• absents • peu clairs • caractéristiques	<b>infection primaire (phase précoce)</b>	adulte : rare enfant et adolescent : fréquent	Contrôler la sérologie dans 3 semaines.
- +	+ +	- -	+ +	• absents • peu clairs • caractéristiques	<b>infection primaire</b>	adulte : rare enfant et adolescent : fréquent	Contrôler la sérologie dans 3 semaines.
- -	+ +	+ -/+	+ +	• absents • peu clairs	<b>fin d'infection primaire (phase transitoire)</b>	Profil fréquent chez l'enfant et l'adolescent	Contrôler la sérologie dans 3 semaines
-	-	+	+	• absents	<b>infection ancienne</b>	Profil fréquent (95% de la population adulte)	2 % des individus n'ont jamais d'EBNA IgG

### AUTRES CAS

ImmunoDOT™ MONO M		ImmunoDOT™ MONO G		Signes cliniques ou hématologiques	INTERPRÉTATION Stade de l'infection EBV	Fréquence du profil	REMARQUES
ACs* MNI**	VCA IgM	EBNA IgG	VCA IgG				
+/-	+	+	+	• absent • peu clairs • caractéristiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infection chronique active ?</li> <li>• Réactivation ?</li> <li>• Infection récente évolutive ?</li> </ul>	Profil fréquent chez les sujets immunodéprimés greffés ou transplantés Plus rare chez les autres sujets	Rechercher et titrer les marqueurs sérologiques suivants : <ul style="list-style-type: none"> <li>• VCA IgM</li> <li>• VCA IgG</li> <li>• EA IgG</li> <li>• CMV IgG et IgM</li> <li>• Toxo IgG et IgM</li> </ul>

(\* ACs = Anticorps hétérophile (\*\* MNI = MonoNucléose Infectieuse)

#### Remarques :

- La présence d'anticorps anti-VCA IgG et d'anti-EBNA IgG confirme une infection passée.
- **Contrôle CMV Non Validé** : La détection des IgG anti-CMV ne permet pas le diagnostic de l'infection par le CMV. Le puits CMV est un puits contrôle, les résultats seront confirmés par des techniques de dosage validées pour le CMV en IgG. Les infections à CMV sont fréquentes et ubiquitaires. La prévalence de l'infection est d'autant plus élevée qu'il s'agit de populations vivant dans des conditions socio-économiques défavorables ou s'il existe de fortes concentrations humaines. En France, environ 50% des adultes de

25 à 30 ans ont des anticorps anti-CMV. La primo-infection à CMV est dans la majorité des cas sans traduction clinique ou de symptomatologie banale. Souvent on observe un syndrome mononucléosique sans anticorps hétérophiles. Le CMV est responsable de 70% des syndromes mononucléosiques post transfusionnels (5,6,7). Le CMV est une des premières causes d'infections chez les greffés et au cours des hémopathies malignes. Les infections à CMV sont aussi très fréquentes au cours du SIDA.

- **Contrôle Toxoplasma gondii Non Validé** : La présence d'IgG anti-Toxoplasmiques peut indiquer une toxoplasmose ancienne. Il est impératif de

confirmer cet état d'immunité en dosant les IgG et IgM par des techniques validées pour la recherche des anticorps anti-Toxoplasma gondii. La toxoplasmose existe sous deux formes : la toxoplasmose acquise et la toxoplasmose congénitale. La toxoplasmose acquise, habituellement bénigne et même très souvent non apparente, est responsable de syndromes mononucléosiques dont les formes graves sont extrêmement rares, survenant principalement chez les sujets immuno-déprimés. La fréquence de la toxoplasmose humaine en France est de 50 à 80 % chez l'adulte.

## ÉVALUATION DE LA TECHNIQUE

Le Test **ImmunoDOT™ EBV MONO G** mesure deux réponses d'anticorps spécifiques : les anticorps anti-EBV VCA IgG et les anticorps anti-EBV EBNA IgG. **La présence d'antigène CMV et toxoplasma ne sert qu'à des fins de contrôle.**

### 1. Pour les anticorps VCA IgG

Les échantillons utilisés pour l'évaluation proviennent d'un laboratoire de référence. L'étude porte sur 51 échantillons: Sensibilité et spécificité relative par rapport à l'Immunofluorescence indirecte.

Dot \ IF	Positif	Négatif
Positif	35	3
Négatif	2	11

**Sensibilité : 94,6%**  
**Spécificité : 78,6%**  
**Concordance : 90,2%**

### 2. Pour les anticorps EBNA IgG

Etude réalisée par un centre de référence pour l'EBV N= 51 Sensibilité et spécificité relative par rapport à l'Immunofluorescence indirecte.

Dot \ IF	Positif	Négatif
Positif	34	1
Négatif	1	15

**Sensibilité : 97,1 %**  
**Spécificité : 93,8 %**  
**Concordance : 96,1%**

### 3. Reproductibilité puits anti-VCA IgG

Estimée sur 3 échantillons: Fortement positif, Positif et négatif pour les puits VCA IgG:

INTRA-ESSAI			INTER-ESSAIS		
Titre Elisa	N	Aspect VCA	N	Aspect VCA	
480 U/ml	+++	5 Sombre cerclé	5	Sombre cerclé	
210 U/ml	+	5 Clair cerclé	5	Clair cerclé	
105 U/ml	-	5 Absence de spot	5	Absence de spot	

### 4. Reproductibilité puits anti-EBNA IgG

Estimée sur 3 échantillons: Fortement positif, Positif et négatif pour les puits EBNA IgG :

INTRA-ESSAI			INTER-ESSAIS		
Titre Elisa	N	Aspect EBNA	N	Aspect EBNA	
600 U/ml	+++	5 Sombre cerclé	5	Sombre cerclé	
330 U/ml	+	5 Clair cerclé	5	Clair cerclé	
155 U/ml	-	5 Absence de spot	5	Absence de spot	

**SCHEMA RÉCAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE**

<b>Préparation : STATION DE TRAVAIL</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Allumer et préparer la station de travail (selon le modèle). <b>La température dans les cuves doit être comprise entre +44°C et +48°C.</b></li> <li>Immerger la bandelette dans le bain d'eau distillée pendant 30 secondes.</li> <li>Distribuer :             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 ml de diluant (1) dans la cuve 1</li> <li>- 2 ml d'activateur (2) dans la cuve 2</li> <li>- 2 ml de conjugué (3) dans la cuve 3</li> </ul> </li> <li>Laisser incuber 10 mn.</li> </ul>	<b>INCUBATION 10 minutes</b>
<b>1. INCUBATION DES SERUMS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ajouter 10 µl de sérum échantillon ou de contrôle positif dans la cuve 1.</li> <li>Plonger la bandelette dans la cuve 1.</li> <li>Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.</li> <li>Laisser incuber 60 mn.</li> </ul>	<b>INCUBATION 60 minutes</b>
<b>2. LAVAGE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.</li> <li>Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant.</li> </ul>	<b>10 secondes</b>
<b>3. ACTIVATEUR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Placer la bandelette dans la cuve 2.</li> <li>Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.</li> <li>Laisser incuber 5 mn.</li> </ul>	<b>INCUBATION 5 minutes</b>
<b>4. LAVAGE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.</li> <li>Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant.</li> </ul>	<b>10 secondes</b>
<b>5. CONJUGUE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Placer la bandelette dans la cuve 3.</li> <li>Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.</li> <li>Laisser incuber 30 mn.</li> <li>Au début de cette incubation, verser <b>2 ml de réactif 4 dans la cuve N°4.</b></li> </ul>	<b>INCUBATION 30 minutes</b>
<b>6. LAVAGE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.</li> <li>Immerger la bandelette dans le clarifiant (eau distillée). Laisser tremper 5 mn.</li> <li>Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant.</li> </ul>	<b>10 secondes puis INCUBATION 5 minutes</b>
<b>7. REVELATEUR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Placer la bandelette dans la cuve 4.</li> <li>Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.</li> <li>Laisser incuber 5 mn.</li> </ul>	<b>INCUBATION 5 minutes</b>
<b>8. LAVAGE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite de façon à ce que le clarifiant (eau distillée) diffuse parfaitement au travers de la membrane.</li> </ul>	<b>10 secondes</b>
<b>9. SECHAGE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Éliminer l'eau résiduelle avec un papier absorbant, et <b><u>laisser sécher avant d'interpréter le résultat.</u></b></li> </ul>	<b>5 minutes</b>

**BioMédical Diagnostics SA**



**Siège social**

Actipole 25  
4 bld de Beaubourg  
77435 Marne la Vallée Cx2  
France

Tél : 33 1 64 62 10 12  
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : [support@bmd-net.com](mailto:support@bmd-net.com)  
Internet : [www.bmd-net.com](http://www.bmd-net.com)



# ImmunoDOT™ EBV MONO-G

REF GB 6085



Qualitative detection of IgG antibodies to Epstein-Barr viral capsid antigen (EBV-VCA) and Epstein-Barr early nuclear antigen (EBV-EBNA) in human serum.

## INTENDED USE

The **ImmunoDOT™ EBV MONO-G Test** is a qualitative enzyme immunoassay (EIA) for the rapid detection of IgG antibodies to Epstein-Barr viral capsid antigen (EBV-VCA) and Epstein-Barr early nuclear antigen (EBV-EBNA) in human serum. This test is intended to be used for the serodiagnosis of any prior infections by EBV. When used in conjunction with the **ImmunoDOT™ EBV MONO-M Test** it is an aid in the serodiagnosis of infectious (EBV) mononucleosis.

## SUMMARY AND EXPLANATION

Infectious mononucleosis (IM) associated with Epstein-Barr Virus (EBV), is a transitory, acute and febrile lymphoproliferative syndrome with a benign course. It is widespread with over 95% of adults having been infected.

Transmission between people is most often through the saliva, and infection is seen earlier with poor sanitation conditions. After penetration into the oral pharynx, the virus multiplies in situ, where the B lymphocytes are secondarily infected during passage into the pharyngeal lymphoid tissue. Venereal transmission would appear to be possible.

EBV Infection may be expressed as:

- an asymptomatic seroconversion;
- a moderate mononucleosidic syndrome with slight fever, sore throat, and adenopathies, particularly in young children;
- an infectious mononucleosis (IM) with sore throat, adenopathies, asthenia (weakness), sensitivity to certain antibiotics (Ampicillin) particularly in adolescents;
- a mononucleosidic syndrome with chronic fatigue ;
- occasional malignant pathologies related to the persistence of the virus in the host such as lymphoma in the immunocompromised patient, undifferentiated nasopharyngeal carcinoma, oral hairy cell leukemia, and Burkitt's lymphoma.

A well defined kinetic assay shows that the antibodies directed against the various EBV antigens appear during the course of the primary infection.

Anti-VCA IgG and IgM antibodies are against capsid antigens. Anti-VCA IgM antibodies appear only during acute infection or rarely during reactivation and disappear within 4 to 8 weeks. Anti-VCA IgG antibodies appear in all primary infections with EBV. After infection, these antibodies decline and persist for life.

Anti-EBNA IgG are antibodies to nuclear antigens. These antibodies appear late after EBV infection. They are always absent during the acute phase of primary infection.

The **ImmunoDOT™ EBV MONO-G test** detects anti-VCA IgG and anti-EBNA IgG antibodies that may appear during or after EBV infection.

EBV infection is serologically diagnosed by concurrent detection of both IgM and IgG antibodies (EBNA IgG, VCA IgG, VCA IgM).

Cytomegalovirus (CMV) and *Toxoplasma gondii* controls have not been validated. Ignore the results obtained for these two parameters.

Testing for anti-CMV and anti-*Toxoplasma* IgG antibodies will have to be performed using validated serological tests.

## ASSAY PRINCIPLE

The **ImmunoDOT™ EBV MONO-G** uses an enzyme-linked immunoassay (EIA) dot technique for the detection of the anti-VCA IgG and anti-EBNA IgG antibodies. The different antigens are present as discrete dots on the assay strip.

First, an assay strip is incubated in a vessel with dilute patient serum, thus allowing any antibodies present in the sample to react with the test antigens immobilized on the assay strip.

In the second step, the specificity is enhanced by removal of non-specifically bound materials.

In the third step the strip is exposed to alkaline phosphatase conjugated to anti-human IgG antibodies so that the enzyme conjugate may bind to any previously bound patient antibodies.

Finally, the strip is transferred to the vessel containing the enzyme substrate reagent which then reacts with the conjugated alkaline phosphatase, producing distinct, clearly visible dots.

## STORAGE CONDITIONS

- Store reagents and assay strips between +2°C and +8°C.
- Reagents must be at room temperature (between +15°C and +30°C) before use. They should be used within an hour following placement in the heated workstation (incubator)
- Avoid contamination of reagents as that can give erroneous results.

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Workstation (incubator)
- Specimen collection apparatus
- Timer
- Analytical quality distilled or deionized water to be used for the washes.
- Pipets
- Absorbent toweling to blot dry the assay strip

## SAMPLE COLLECTION AND HANDLING

- The **ImmunoDOT™ EBV MONO-G Test** is performed on serum. The test requires 10 µL of serum.
- Avoid Lipemic or hemolyzed serum specimens has not been shown to be an acceptable specimen.
- Collect the samples of serum aseptically and store them between +2°C and +8°C for a maximum of 48 hours.
- If the assay of the samples will not be completed within 48 hours, or for shipment of the specimens, freeze at -20°C

## MATERIAL PROVIDED

		GB 6085
<b>ImmunoDOT™ EBV MONO-G Assay Strip</b>		50
(*) partially purified EBV lysate from cell strain P3HR1		
<b>Diluent</b>	<input type="checkbox"/> DIL <input type="checkbox"/> SPE	2 x 50mL
Consists of buffer (pH 6.2-7.6) containing IgG absorbent (goat anti-human IgG), protein stabilizers, and <0.1% NaN <sub>3</sub> .		
<b>Enhancer</b>	<input type="checkbox"/> SOLN <input type="checkbox"/> ENH	2 x 50mL
Consists of sodium chloride and <0.1% NaN <sub>3</sub> .		
<b>Conjugate</b>	<input type="checkbox"/> CONJ <input type="checkbox"/> IgG	2 x 50mL
Consists of alkaline phosphatase conjugated goat anti-human IgG (heavy chain specific) in buffered diluent (pH 6.2-7.6), with protein stabilizers.		
<b>Developer [substrat]</b>	<input type="checkbox"/> SUBS <input type="checkbox"/> BCIP-NBT	2 x 50mL
Consists of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and p-nitro blue tetrazolium chloride in buffered diluent (pH 8.0-11.0), 0.8% dimethylformamide and <0.1% NaN <sub>3</sub>		
<b>Positive control</b>	<input type="checkbox"/> CONTROL <input type="checkbox"/> +	1 x 100μL
<b>Reaction Vessels</b>	200	
<b>Package Insert</b>	1	

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *In Vitro* Diagnostic Use Only.

The **ImmunoDOT™ EBV MONO-G** reagents have been optimized for use as a system. Do not substitute reagents or strips from any other source including those from other **ImmunoDOT** systems.

Dilution or modification of these reagents may also affect the performance of the test.

Do not use kits after the stated expiration date.

Analytical quality deionized or distilled water must be used for the washes.

Strictly adhere to the test procedures for optimal results. Do not shorten or prolong stated incubation times as this may result in poor assay performance.

Some assay components contain sodium azide (NaN<sub>3</sub>) that may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. After disposing of reagents, flush sink with a large volume of water to prevent azide buildup.

Human sera used in the preparation of this product were tested and found non-reactive for hepatitis B surface antigen and for antibodies to HIV-1, HIV-2, HTLV-1, and hepatitis C virus. Because no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, handle reagents and patient samples as if capable of transmitting infectious disease.

## SETUP

- Turn on Workstation and adjust temperature according to the instructions for use of your instrument.
- Remove 4 Reaction Vessels per test from the product box and insert into appropriate slots in Workstation.  
*For the large Workstation*, add water up to the fill line of the Wash Vessel provided.  
*For the small Workstation*, use an appropriate container and sufficient water to cover all reactive areas/dots of the assay strip.
- Appropriately label the Assay Strips.
- Place:
  - 2 mL Diluent (#1) in Reaction Vessel #1
  - 2 mL Enhancer (#2) in Reaction Vessel #2
  - 2 mL Conjugate (#3) in Reaction Vessel #3
- Incubate for 10 minutes.
- Verify that the temperature of the heating block is in accordance with the instructions of the manual corresponding to the model of the workstation.
- Insert the strip in the distilled water bath (Wash) for 30 seconds, just before starting the assay procedure. Avoid the formation of bubbles on the surface.

## ASSAY PROCEDURE

### 1. SAMPLE INCUBATION

- Add 10 μL serum sample or positive control to Reaction Vessel #1.
- Plunge assay strip into Reaction Vessel #1
- Using 10 quick up and down motions with the Assay Strip, mix contents thoroughly.
- Let stand for 60 minutes.

### 2. WASH STEP

- Remove Assay Strip from Reaction Vessel and swish in the Wash (distilled water). Use a swift back and forth motion for 10 seconds allowing for optimal washing of the Assay Strip.
- Blot the strip on an absorbent towel.

### 3. ENHANCER

- Place Assay Strip into Reaction Vessel #2.
- Mix thoroughly with 10 quick up and down motions.
- Let stand for 5 minutes.

### 4. WASH STEP

- Remove Assay Strip from Reaction Vessel #2 and swish in the Wash for 10 seconds as described (step #2) for 10 seconds. The wash should diffuse completely through the strip.
- Blot the strip on an absorbent towel.

### 5. CONJUGATE

- Place Assay Strip into Reaction Vessel #3.
- Mix thoroughly with 10 quick up and down motions.
- Let stand for 30 minutes.
- At the beginning of this incubation, place 2mL of reagent #4 into the Reaction Vessel #4.

### 6. WASH STEP

- Remove Assay Strip from Reaction Vessel #3 and swish in the Wash as described (step #2) for 10 seconds. The wash should diffuse completely through the strip
- DO NOT remove the Assay Strip from the wash.
- Allow the Assay Strip to stand in the wash for 5 minutes.
- Blot the strip on an absorbent towel.

## 7. DEVELOPER

- Remove Assay Strip from wash and place into Reaction Vessel #4.
- Mix thoroughly with 10 quick up and down motions.
- **Let stand for 5 minutes.**

## 8. WASH STEP

- Remove Assay Strip from Reaction Vessel #4 and swish in the Wash as described (step #2) for 10 seconds. The wash should diffuse completely through the strip.

## 9. DRY

- Blot and allow Assay Strip to dry. It is imperative that tests of borderline specimens be interpreted after the Assay Strip has been allowed to dry. **A false positive dot may be identified if the assay strip is not dry when interpreted.**

## 10. READING THE ASSAY STRIP

**Positive:** A dot with an **EASILY SEEN**, distinct border is visible in the center of the window. The outer perimeter of the window must be white to pale gray.

**Negative:** If no dot is seen or a dot is difficult to see, interpret it as negative.

Each dot of the assay strip is read independently.

## QUALITY CONTROL

The dots of positive and negative controls must appear correctly; otherwise the test needs to be repeated.

The color intensity of the positive control must not be used as a calibrator. The reactions in dots containing antigens could have a different intensity than the positive control, because of a difference in the concentration of antibodies.

**The positive control serum** included in this kit, is moderately positive for all antibodies. The performance of every kit can be confirmed upon receipt by using this control which is expected to give a positive result.

The analysis is performed with reagents warmed at +44°C/+ 48°C. The temperature of the workstation has to exceed the temperature in the reaction vessels. The temperature of the workstation must be watched.

## LIMITATIONS

- ⇒ This is a qualitative test, and therefore it cannot be used to detect changes in antibody titers.
- ⇒ Primarily maternal antibodies will be detected in children less than one year of age.
- ⇒ Lipemic or hemolysed samples or samples contaminated by bacteria could provide erroneous results.
- ⇒ The **ImmunoDOT™ EBV MONO G** test used alone is not in any case diagnostic for mononucleosis infectious due to the Epstein Barr virus.
- ⇒ The complete serologic profile of an infection to EBV should include determinations for the presence of antibodies directed against the different EBV-antigens appearing during the course of infection: EBV VCA IgM, EBV VCA IgG and EBV EBNA IgG.
- ⇒ If one wants to determine the state of reactivation in an immunocompromised patient or show that the EBV is associated with a malignant disease, it is essential to determine titers of the anti-EA (early antigen) antibodies.
- ⇒ **The CMV controls and toxoplasma gondii have not been validated. Ignore any results associated with these two parameters. Any testing for anti- CMV and anti-Toxoplasma antibodies must be performed using validated serologic tests.**

⇒ The interpretation of the results of the **ImmunoDOT™ EBV MONO G** test should be done in parallel with those obtained with the **ImmunoDOT™ EBV MONO M** test which provides for the detection of anti-VCA isotype IgM antibodies.

## REFERENCES

Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (1999).

Lennette, ET, Manual of Clinical Microbiology, 4th Ed.(Lennette, Balows, Housler, and Shadomy, eds) pp 728, ASM Press, Washington DC (1985).

Evans, AS, Medcal Virology VII (de la Maza and Peterson, eds) pp 57, Elsevier New-York, NY (1988).

Naraqui,S, Textbook of Human Virology (Belshe,ed), pp 892, PSG Publishing Littleton, MA (1984).

Perham TGM,EO Caul, RJ Conway,et al, Brit.J.Haematol 20:307 (1971).

Kane, RC, WE Rousseau, GR Noble, et al., Infect Immun 11:719 (1975).

Klemola, D,R. Von Essen, J. Paloheimo, et al., Scand.J. Infect.Dis 1:137 (1969).

McCabe RE and JS Remington, Principles and Practice of Infectious Diseases (Mandel, Douglas and Bennett, eds) pp 1542, John Wiley and Sons, New -York NY (1985).











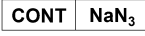

J-M Seigneurin, Infections à virus Epstein-Barr. Encyclopédie Médico-Chirurgicale (Paris)

J-M.Seigneurin et M.Buisson, Sérologie du virus d'Epstein-Barr : aspects pratiques et interprétation des résultats. Feuilles de Biologie, 1990 -Vol.XXXI-N°174.

F.Denis, S.Ranger-Rogez et A. Vovor. L'Eurobiologiste 1994, tome XXVIII, n° 209 p.47-60

Lennette EH, Lennette DA, and Lennette ET. Epstein-Barr Virus, in Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections ( 7 th Ed ), Chapter 18, American Public Health Association, Washington DC, Lennette, ET, 1995.

## SYMBOLS USED

	EC Declaration of conformity
	Rapid test
	In Vitro Diagnostic Device
	Catalogue number
	Lot Number
	Expiry Date
	Number of test
	Consult Instructions
	Temperature limitation
	Biological risk
	Contains sodium azide
	Reconstitute with

## INTERPRETATION

Reading and interpreting the VCA and EBNA antibodies dots. The **ImmunoDOT™ EBV MONO G** kit is a test for the rapid, qualitative detection of EBV VCA IgG and EBV EBNA IgG antibodies.

ImmunoDOT™ MONO M		ImmunoDOT™ MONO G		Hematological and clinical symptoms	INTERPRETATION EBV infection steps	Frequency of the pattern	REMARKS
ACs* MNI**	VCA IgM	EBNA IgG	VCA IgG				
-	-	-	-	• negative	<b>Seronegative patient (no infected)</b>	adult: rarely child: frequent	
-/+	+	-	-	• negative • indeterminate • characteristic	<b>Primary infection (early step)</b>	adult: rarely child and teenager: frequent	Serological Testing in 3 weeks
- +	+ +	- -	+ +	• negative • indeterminate • characteristic	<b>Primary infection</b>	adult: rarely child and teenager: frequent	Serological Testing in 3 weeks
- -	+ +	+ -/+	+ +	• negative • indeterminate	<b>End of primary infection (passing step)</b>	Frequent patterns for child and teenager	Serological Testing in 3 weeks
-	-	+	+	• negative	<b>Past infection</b>	Frequent pattern (95% of the adult population)	2 % of patients never have anti-EBNA antibodies

## OTHERS

ImmunoDOT™ MONO M		ImmunoDOT™ MONO G		Hematological and clinical symptoms	INTERPRETATION EBV infection	Pattern and frequency	REMARKS
ACs* MNI**	VCA IgM	EBNA IgG	VCA IgG				
+/-	+	+	+	• negative • indeterminate • characteristic	<ul style="list-style-type: none"> <li>• acute chronic infection?</li> <li>• Reactivation?</li> <li>• Recent infection with evolution?</li> </ul>	Frequent patterns in immunodeficient patient with transplantation Rarely in other patients	Test following serological parameters : 1. IgM VCA 2. IgG VCA 3. IgG EA 4. IgG and IgM CMV 5. IgG and IgM Toxo

(\* ACs = heterophile antibodies (\*\* MNI = Infectious MonoNucleosis)

### Remarks:

- The presence of anti-VCA IgG and anti-EBNA IgG antibodies is confirmatory for past infection
- CMV Control not validated:** The IgM anti-CMV detection does not allow the diagnosis of the infection by CMV. The CMV well is a control well; results should be confirmed by other validated IgG and IgM CMV tests. CMV infections are frequent and ubiquitous. The prevalence of the infection is higher in populations living in conditions of poor sanitation or in densely populated areas (4). In France, approximately 50% of the adults from

25 to 30 years have anti-CMV antibodies. The majority of cases of primary infection with CMV are without clinical symptoms or distinct symptoms. Often mononucleosis syndromes lack heterophile antibodies. CMV is the source of 70% post transfusion mononucleosis syndromes (5,6,7). CMV is the primary cause of infections in transplant patients and during malignant hemopathy. CMV infections are also very frequent during the course of AIDS.

- Toxoplasma gondii Control not validated:** The presence of anti-Toxoplasma IgG can indicate past infection by Toxoplasma. It is

imperative to confirm this state of immunity by detecting with validated tests anti-Toxoplasma gondii IgG and IgM antibodies. Toxoplasmosis exists in two forms: acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis. The acquired form of toxoplasmosis (usually benign and often not apparent) is responsible for extremely rare, serious mononucleosis syndromes that occur mainly in immunocompromised subjects. The frequency of human toxoplasmosis in adults in France is 50 to 80 %.

## PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS OF THE TEST

**ImmunoDOT™ EBV MONO G** test allows the detection of IgG anti-EBV VCA and IgG anti-EBV EBNA antibodies. **The presence of CMV and toxoplasma antigens is used only for the controls.**

### 1. IgG anti-VCA antibodies

A prospective study was performed in a reference center on 51 patient samples. The test has been compared to immunofluorescence (IF).

Dot \ IF	Positive	Negative
Positive	35	3
Negative	2	11

**Sensitivity: 94.6 %**  
**Specificity: 78.6 %**  
**Agreement: 90.2%**

### 2. IgG EBNA antibodies

Study carried out by a center of reference for the EBV N = 51: The test has been compared to immunofluorescence (IF).

Dot \ IF	Positive	Negative
Positive	34	1
Negative	1	15

**Sensitivity : 97.1 %**  
**Specificity : 93.8 %**  
**Agreement : 96.1%**

### 3. Reproducibility IgG anti-VCA spots

Reproducibility was performed on 3 sample ranges: strongly positive, positive and negative for IgG anti-VCA dots:

INTRA-ASSAY			INTER-ASSAYS		
ELISA level	N	VCA appearance	N	VCA appearance	
480 U/mL	+++	5	Dark circle	5	Dark circle
210 U/mL	+	5	Light circle	5	Pale circle
105 U/mL	-	5	No spot	5	No spot

### 4. Reproducibility IgG anti-EBNA dots

Reproducibility was performed on 3 samples ranges: strongly positive, positive and negative for IgG anti-EBNA dots:

INTRA-ASSAY			INTER-ASSAYS		
ELISA level	N	EBNA appearance	N	EBNA appearance	
600 U/mL	+++	5	Dark circle	5	Dark circle
330 U/mL	+	5	Pale circle	5	Pale circle
155 U/mL	-	5	No spot	5	No spot

**SUMMARY OF METHOD**

<b>SETUP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Turn on and prepare the workstation (according to the model). <b>The temperature in vessels must lie within +44°C and +48°C.</b></li> <li>• Insert the strip in the distilled water bath (Wash) for 30 seconds.</li> <li>• Pipet:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 mL of diluent (#1) into reaction vessel #1</li> <li>- 2 mL of enhancer (#2) into reaction vessel #2</li> <li>- 2 mL of conjugate (#3) into reaction vessel #3</li> </ul> </li> <li>• Incubate for 10 min.</li> </ul>	<b>INCUBATION 10 minutes</b>
<b>1. INCUBATION OF SERA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Add 10 µL of sample sera or positive control to vessel #1.</li> <li>• Immerse strip in reaction vessel #1.</li> <li>• Mix using a swift up and down motion 10 times.</li> <li>• Incubate for 60 min.</li> </ul>	<b>INCUBATION 60 minutes</b>
<b>2. WASH STEP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wash the strip in the Wash (distilled water) using a swift back and forth motion from left to right so that the water diffuses completely through the membrane.</li> <li>• Blot the assay strip on an absorbent towel.</li> </ul>	<b>10 seconds</b>
<b>3. ENHANCER</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Place strip into vessel #2.</li> <li>• Mix using a swift up and down motion 10 times.</li> <li>• Incubate for 5 min.</li> </ul>	<b>INCUBATION 5 minutes</b>
<b>4. WASH STEP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wash the in the Wash (distilled water) using a swift back and forth motion from left to right so that the water diffuses completely through the membrane.</li> <li>• Blot the assay strip on an absorbent towel.</li> </ul>	<b>10 seconds</b>
<b>5. CONJUGATE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Place strip into vessel #3.</li> <li>• Mix using a swift up and down motion 10 times.</li> <li>• Incubate for 30 min.</li> <li>• At the start of this incubation, <b>place 2 mL of reagent #4 into vessel #4.</b></li> </ul>	<b>INCUBATION 30 minutes</b>
<b>6. WASH STEP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wash the strip in the Wash (distilled water) using a swift back and forth motion from left to right so that the water diffuses completely through the membrane.</li> <li>• Immerse the strip in the Wash (distilled water). Let stand 5 minutes.</li> <li>• Blot the assay strip on an absorbent towel.</li> </ul>	<b>10 seconds then INCUBATION 5 minutes</b>
<b>7. DEVELOPER</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Place strip into vessel #4.</li> <li>• Mix using a swift up and down motion 10 times.</li> <li>• Incubate for 5 min.</li> </ul>	<b>INCUBATION 5 minutes</b>
<b>8. WASH STEP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wash the strip in the Wash (distilled water) using a swift back and forth motion from left to right so that the water diffuses completely through the membrane.</li> </ul>	<b>10 seconds</b>
<b>9. DRY STEP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remove the residual water with absorbent paper, and <b>let dry before interpreting the result.</b></li> </ul>	<b>WAIT 5 minutes</b>

**BioMédical Diagnostics SA**



**Office**

Actipole 25  
4 bld de Beaubourg  
77435 Marne la Vallée Cx2  
France

Tel : 33 1 64 62 10 12  
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : [support@bmd-net.com](mailto:support@bmd-net.com)  
Internet : [www.bmd-net.com](http://www.bmd-net.com)