



- Хранить раствор хромогена/субстрата при 2-8 °С. Реагент должен оставаться закрытым, если не используется.
- Хранить разведенный промывочный концентрат при 21-25 °С до 5 дней, или до 7 дней при 2-8 °С.

**Примечание:** при постоянной температуре хранения реагенты и субстрат остаются стабильными до окончания срока годности. См. на этикетке упаковки срок годности. Меры предосторожности были приняты в производстве этого продукта для защиты реагентов от загрязнения, и бактериостатические агенты были добавлены к жидким реагентам. Следует проявлять осторожность, чтобы защитить реагенты этого набора от загрязнения.

#### МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Для диагностического использования *in vitro*.
- Калибратор и контроли содержат компоненты человеческого происхождения, которые были протестированы и оказались неактивными по отношению к поверхностному антигену гепатита В, а также к антителу ВИЧ, при взаимодействии с реактивами, лицензированными Управлением по контролю за продуктами и лекарствами (США).
- Так как не существует метода, который может предложить полную уверенность в том, что ВИЧ, вирус гепатита В или другие инфекционные агенты отсутствуют, с этими реагентами необходимо обращаться, придерживаясь 2-го Уровня Биологической Безопасности, рекомендованного инструкциями Центров Контроля заболеваний/ Национальными Институтами Здравья, "Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях."
- Не смешивать компоненты разных производителей.
- Не использовать реагенты после окончания срока годности, указанного на этикетке.
- Все реагенты должны быть при комнатной температуре (21-25 °С) перед использованием. Брать только необходимое количество реагента. **Не возвращать реагенты обратно в пробирку, это может привести к загрязнению.**
- Перед открытием пробирок с Контролем и Калибратором, убедиться, что вся жидкость находится на дне пробирки.
- Использовать только дистиллированную или деионизированную воду и чистые пробирки.
- Не допускать высыхания лунок во время тестирования; добавлять реагенты сразу же после завершения шага промывки.
- Избегать загрязнения реагентов. Мыть руки до и после обращения с реагентами. **Загрязнение реагентов и/или образцов может привести к ложным результатам.**
- Если промывка проводится вручную, лунки должны промыться 3 раза. При автоматической промывке может потребоваться промывание до 5 раз.
- Азид натрия сдерживает активность Конъюгата. Чистые пипетки должны использоваться для добавления Конъюгата, чтобы азид натрия не передавался от других реагентов.**
- Азид натрия считается таким, который образует азиды свинца и меди во внутренней канализации лаборатории. Во избежание этого, тщательно промойте раковину водой после утилизации раствора с азидом натрия.
- Никогда не пипетируйте ртом. Избегайте контакта реагентов и образцов пациентов с кожей или слизистыми оболочками. Реагенты, содержащие проклин, азид натрия и ТМВ, могут быть раздражителями. Избегайте контакта с кожей и глазами. Промыть с большим количеством воды в случае попадания.
- Если раствор гипохлорита натрия используется как дезинфицирующее средство, не использовать его во время проведения процедуры.
- Избегать контакта со стоп раствором. Причиняет ожоги. Токсичен при вдыхании, при контакте с кожей и при заглатывании. При несчастном случае или при плохом самочувствии немедленно обратитесь за медицинской помощью.
- Предостережение:** Жидкие отходы в кислоте рН должны быть нейтрализованы перед добавлением к отбеливающему веществу.
- Концентрации анти-EBNA могут варьироваться у разных производителей.

#### СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Обращаться с образцами крови и сыворотки как с потенциально опасными.
- Оптимальная работа теста зависит от того, насколько свежими являются образцы. Рекомендуется минимальный объем в 50 мкл, на случай, если потребуются повторное тестирование. Образцы должны быть взяты венопункцией. Раннее отделение от стругков предотвращает гемолиз сыворотки.
- Если тестирование будет проводиться в течение 2 дней, хранить сыворотку при 2-8 °С. Для более длительного

хранения, заморозить до – 20 °С. Ненадлежащее хранение или повторное замораживание-оттаивание может привести к неверным результатам.

- NCCLS дает рекомендации по хранению образцов.

#### МЕТОДЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

##### Подготовка к анализу

- Приведите все образцы и реагенты к комнатной температуре (21-25°С). Вернуть все реагенты в холодильник после использования.
- Все образцы и контроли должны быть тщательно перемешаны перед использованием.
- Разбавить 50 мл 20 х Промывочного буфера типа I до 1 литра с дистиллированной и/или деионизированной водой H<sub>2</sub>O. Тщательно перемешать.

#### ОБРАЩЕНИЕ С СЫВОРОТКОЙ

ИФА для выявления вирус-специфических IgM, как известно, является чувствительным к интерферирующим факторам. Этот набор преодолевает помехи путем обработки образцов до проведения анализа. Анти-человеческие IgG козы/овцы в Разбавителе для сыворотки Plus уменьшают конкурирующие вирус-специфические IgG, которые отвечают за ложно негативную реакцию. Ложно отрицательные результаты так же минимизируются путем удаления IgG, таким образом, нейтрализуя связанный ревматоидный фактор в образцах.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Поместить необходимое количество стрипов в держатель. Провести 6 (шесть) определений Контроль/Калибратор (1 Отрицательный контроль, 3 калибратора и по 1 (одному) каждого Высокоположительного и Низкоположительного Контролей) в одном анализе. контрольный реагент должен тестироваться в каждом анализе. Проверить программное обеспечение и считывающее устройство на корректность настройки. Вернуть неиспользованные полоски в упаковку с осушителем и немедленно поместить в холодильник.

#### Пример конфигурации:

Расположение пластины	Описание образца	Расположение пластины	Описание образца
1A	RB	2A	Пациент №2
1B	NC	2B	Пациент №3
1C	Cal	2C	Пациент №4
1D	Cal	2D	Пациент №5
1E	Cal	2E	Пациент №6
1F	HPC	2F	Пациент №7
1G	LPC	2G	Пациент №8
1H	Пациент №1	2H	Пациент №9

RB = реагент бланк – Лунка без добавления сыворотки, проведение анализа со всеми реагентами. Используется для пустого считывания.

NC = Отрицательный контроль

Cal = Калибратор

HPC = Высокоположительный контроль

LPC = Низкоположительный контроль

- Развести тестируемую сыворотку, калибратор и Контрольную сыворотку 1:81 (например, 10 мкл + 800 мкл) в разбавителе для сыворотки. Тщательно перемешать. (При ручном разбавлении рекомендуется поместить разбавитель в тестируемую пробирку сначала, затем добавить сыворотку пациента).
- Внесите по 100 мкл разбавленных сывороток, калибратора и контролей в соответствующие лунки. Для реагента бланка, внесите 100 мкл разбавителя образца. Проверить программное обеспечение и считывающее устройство на корректность настройки.
- Инкубировать каждую лунку при комнатной температуре (21-25 °С) в течение **30 ± 2 минуты**.
- Удалить жидкость из лунок. Если используется автоматическое или полуавтоматическое моеющее оборудование, добавить 250-300 мкл разбавленного Моющего буфера в каждую лунку. Удалите жидкость из лунок. Повторите промывание промывочным буфером 2 раза (в общем 3 раза) для ручной промывки или полуавтоматического оборудования или 4 раза (в общем 5 раз) для автоматического оборудования. После финальной промывки удалить всю жидкость из лунок, перевернув пластину на бумажные полотенца.

**\*\*ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ:** что касается шагов 5 и 8 – недостаточная или излишняя промывка могут привести к вариации результатов и повлиять на них. Поэтому, для лучших результатов, рекомендуется настройка полуавтоматического или автоматического оборудования на доставку достаточного количества для полного

заполнения каждой лунки (250-300 мкл). При автоматической промывке необходимо до 5 промываний.

**Полное удаление промывочного буфера после последней промывки является обязательным условием для надлежащей работы теста. Также убедитесь в отсутствии воздушных пузырьков в лунках.**

6. Внесите 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку, включая лунку реагента бланка. Избегать образования воздушных пузырей, так как это может привести к ложным результатам.
7. Инкубировать каждую лунку при комнатной температуре (21-25 °C) в течение **30 ± 2 минуты**.
8. Повторить промывку, как описано в шаге 5.
9. Внесите 100 мкл ТМБ субстрата в каждую лунку, включая лунку реагента бланка, придерживаясь постоянной скорости добавления.
10. Инкубируйте при комнатной температуре (21-25 °C) в течение **15 ± 2 минуты**.
11. Добавьте 100 мкл стоп раствора для остановки реакции. Постучать аккуратно по стенкам пластины для тщательного перемешивания содержимого лунок. Оставить до 1 часа перед считыванием результатов.
12. Считайте ОП микролуночным ридером при 450 нм. Если используется двойная длина волны, установить фильтр на 600-650 нм. Проверить инструмент на отсутствие воздушных пузырей. Реагент бланк должен иметь плотность меньше 0.150 при 450 нм. Если эта величина  $\geq 0.150$ , повторите анализ. Избавиться от использованных пластин после получения результатов.

### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Анализ будет действительным при выполнении следующих условий:

1. Калибратор и контроли должны использоваться при каждом анализе.
2. Реагент бланк (при считывании с отсутствием воздуха) должен иметь значение ОП (A)  $< 0.150$  при 450 нм.
3. Отрицательный контроль должен иметь значение A  $< 0.250$  при 450 нм (при считывании против реагента бланка).
4. Каждый калибратор должен иметь значение A  $> 0.250$  при 450 нм (при считывании против реагента бланка).
5. Высокоположительный контроль должен иметь значение A  $> 0.500$  при 450 нм (при считывании против реагента бланка).
6. Значения ISR (Соотношение иммунного Статуса) для Высокоположительного, Низкоположительного и Отрицательного Контролей должны быть в соответствующих пределах, указанных на этикетках. Если контрольные значения не попадают в указанные границы, тест считается не действительным, он должен быть проведен повторно.
7. Дополнительные контроли могут быть протестированы в соответствии с местными требованиями.
8. Обратиться к NCCLS C-24 за указаниями по контролю качества.
9. Если вышеперечисленные критерии не соблюдаются, обратиться к производителю.

### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

#### Вычисление результатов

1. Средняя Оптическая Плотность ОП Калибратора – определить ОП для калибратора из трех определений. Если какое-либо из 3 значений отличается от среднего больше, чем на 15 %, отбросить это значение и подсчитать среднее из оставшихся двух.
2. Поправочный коэффициент – Для подсчета отклонений из-за температуры и временного фактора, определяется поправочный коэффициент для каждой партии. Указан на этикетке пробирки Калибратора.
3. Предельное значение Калибратора – определяется для каждого анализа умножением Поправочного коэффициента на Среднее значение ОП Калибратора, рассчитанного в шаге 1.
4. Значение ISR – рассчитать для каждого образца делением значения ОП образца на пороговое значение Калибратора, полученное в шаге 3.

#### Например:

Значения ОП, полученные для калибратора = 0.38, 0.40, 0.42  
 Среднее значение Оп Калибратора = 0.40  
 Поправочный коэффициент = 0.50  
 Пороговое значение калибратора =  $0.50 \times 0.40 = 0.20$   
 ОП, полученное для сыворотки пациента = 0.60  
 Значение ISR =  $0.60/0.20 = 3.00$

#### Анализ

1. Значения ISR пациентов интерпретируются как показано ниже:

ISR	Результаты	Интерпретация
$\leq 0.90$	Отрицат.	IgM антитела к EBNA-1 не обнаружены
	Сомнительный	Образцы, которые остаются сомнительными

0.91-1.09		после повторного тестирования, должны быть протестированы альтернативным методом. Если результаты остаются сомнительными, провести тестирование дополнительного образца
$\geq 1.10$	Положит.	IgM антитела к EBNA-1 обнаружены

2. Образцы, которые остаются сомнительными после повторного тестирования, должны быть протестированы ещё раз альтернативным методом, например, иммунофлюоресценции (IFA).
3. Для определения порогового значения анализа, были протестированы 57 нормальных образцов с использованием данного метода. Среднее и стандартное отклонения ОП составили 0.206 и 0.182, соответственно. Положительный порог анализа был определен добавлением среднего и 2.5 стандартных отклонений ( $0.206 + 2.5(0.182) = 0.67$ ). Положительная сыворотка была титрована, чтоб дать постоянное соотношение значения порога для получения Калибраторной сыворотки. По определению предельное значение ISR равно 1.00.
4. DAI EBNA-1 IgM ELISA тест использовался для получения данных результатов. Значения, полученные с использованием других методов, не могут использоваться как взаимозаменяемые.
5. 4 (четыре) характерных для ВЭБ антител используются для предоставления полной картины заболевания ВЭБ: это капсидное IgM антитело, капсидное IgM антитело, IgM антитело к раннему антигену и ядерное антитело к ВЭБ. Аккуратная интерпретация инфекции ВЭБ основана на результатах от всех этих антител, и не должна основываться на результатах одиночного теста.

### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

#### Фаза остроого заболевания

EBNA-1 IgM быстро увеличиваются на РАННЕЙ острой фазе и могут быть обнаружены до или одновременно с VCA IgG и IgM и гетерофильными антителами. EBNA IgM-1 снижаются во время ПОЗДНЕЙ фазы наряду с VCA IgM, но сохраняются IgG VCA.

#### Промежуточная фаза:

EBNA IgM-1 снижаются до низкого и примерно такого же уровня, что и EBNA-1 IgG, которые начинают увеличиваться. VCA IgG сохраняются.

#### Фазу выздоровления:

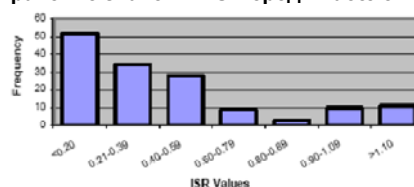
EBNA-1 IgM на очень низком уровне либо отрицательные, EBNA-1 IgG увеличиваются до высокого уровня.

**Примечание:** EBNA IgM-1 время от времени обнаруживаются в фазе выздоровления.

#### Распространение

Группа из 157 сывороток от нормального населения различных возрастов, полов и географических районов США была протестирована с помощью теста DAI EBNA-1 IgM ELISA. Положительный показатель для DAI EBNA-1 IgM ИФА составил 7.0 % и сомнительный показатель составил 6.4 %. Распространение в литературе составляет 1-2 % у практически здоровых доноров крови (19). Распределение значений ISR из этого исследования представлено в диаграмме 1 ниже:

Распространение значений ISR среди населения (n=157)



### ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Внимательное прочтение и полное понимание инструкции обязательны. Для получения надежных результатов строго придерживаться инструкции. В частности, корректное пипетирование образца и реагентов, аккуратная промывка и соблюдение временных границ инкубационных шагов необходимы для получения точных результатов.
2. Результаты ИФА, полученные с образцами сывороток от пациентов с ослабленным иммунитетом, должны интерпретироваться с осторожностью.
3. Образцы, которые остаются сомнительными после повторного тестирования, должны быть протестированы ещё раз альтернативным методом, например, иммунофлюоресценции (IFA). Если результаты остаются сомнительными после

дальнейшего тестирования, дополнительные образцы должны быть взяты.

4. Это устройство не предназначено для определения иммунного статуса. Оно предназначено для определения иммунной реакции, которая указывает на первичную инфекцию или реактивацию вируса.
5. Отсутствие определяемых антител IgM не исключает возможности недавней или текущей инфекции. Если EBV инфекция все еще подозревается, провести забор второго образца через 5-7 дней и повторить тестирование. Часто, однако, во время взятия образца, IgM антитела находятся в сниженных концентрациях.
6. Специфические IgG могут конкурировать с IgM за сайты, что может привести к ложным отрицательным результатам. С другой стороны, ревматоидный фактор в присутствии специфических IgG может привести к ложно положительной реакции. Анти-человеческие IgG козы/овцы в Разбавителе Plus уменьшают конкурирующие специфические IgG и минимизируют помехи ревматоидного фактора в образцах. Разбавитель сыворотки Плюс разработан для удаления IgG из сыворотки для выражения IgG в различных концентрациях. В конечном разведении образца 1:81, в Разбавителе Plus было продемонстрировано удаление > 99% IgG в концентрациях 340 мг/дл, и 2250 мг/дл. Это соответствует значениям в избытке крайнего высокого и крайнего нижнего приемлемого нормального диапазона IgG (~ 700-1500 мг/дл). Образцы <340 мг/дл и >2250 мг/дл следует интерпретировать с осторожностью.
7. Гетеротипические (ложно положительные) IgM результаты могут быть получены у пациентов, инфицированных CMV, а также у пациентов, инфицированных HSV1.
8. Некоторые антинуклеарные антитела, вызывающие ложно положительные реакции, были обнаружены в некоторых тестах ELISA.
9. Результаты этого теста должны интерпретироваться врачом с учетом других клинических данных и диагностических процедур.
10. Отрицательный тест для EBV EBNA-1 (IgM) не исключает текущей EBV инфекции. Образцы могли быть взяты до развития явных антител или антител, которые все ещё обнаруживаются.
11. Результаты анализов, полученных при анализе образцов детей, должны рассматриваться с осторожностью.
12. Избегать использования иктерических, липемических, гемолизированных или инaktivированных нагреванием сывороток, так как это может привести к ошибочным результатам.
13. Не использовать другие наборы или процедуры, что может привести к сомнительным результатам.
14. Эксплуатационные характеристики были установлены для использования сывороток.
15. Широкое распространение аналита будет влиять на прогностическое значение анализа.
16. Рабочие характеристики не были установлены для пациентов с раком носоглотки, лимфомой Беркитта, других связанных с EBV лимфаденопатий, ВЭБ и других заболеваний.
17. Поскольку антитела EBNA-1 IgM могут присутствовать в нормальной сыворотке выздоравливающих, один результат не может быть использован для установления диагноза. Точная интерпретация инфекционного мононуклеоза основывается на результатах VCA IgG, VCA IgM, IgG EBNA, EA-D IgG и гетерофильных антител.
18. Образцы со значениями, близкими к граничным, могут стать сомнительными после поглощения сыворотки.
19. Рабочие характеристики этого анализа не были получены для педиатрических образцов.

#### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

##### Чувствительность и Специфичность, основанные на характеристике сыворотки

Сто шестьдесят шесть выбранных замороженных образцов сыворотки тестировали в клинической лаборатории в средне-атлантическом регионе США. Сыворотки из анализа были охарактеризованы как серонегативные (нет серологического подтверждения перенесенной или настоящей инфекции EBV), острог заболевания (присутствуют антитела VCA IgM и гетерофильные антитела, IgG EBNA отсутствуют) или серопозитивные (наличие антител IgG VCA и EBNA IgG, без признаков VCA IgM или гетерофильных антител, что свидетельствует о перенесенной инфекции). Чувствительность, специфичность и правильность анализа были определены, основываясь на этой характеристике. Было предположено, что реакция EBNA-1 IgM должна быть отрицательной для серонегативной сыворотки и сыворотки при выздоравливающей форме, и положительной для острой формы. Результаты представлены в таблицах 1 и 1А.

**Таблица 1**  
**Чувствительность и Специфичность, основанные на характеристике сыворотки**

		Острая форма VCA IgM+ EBNA IgG- Heterophile+	Сероположит. VCA IgG+ EBNA IgG+ VCA IgM- Heterophile-	Сероотрицат. VCA IgG- EBNA IgG- VCA IgM- Heterophile
DAI	Положит.	19	5	0
EBNA-1 IgM	Сомнит.	2	8	0
	Отрицат.	18	86	28
	Всего	39	99	28

**Таблица 1А**  
**Данные Относительной Чувствительности и Специфичности**

	Результаты**	Результаты, %	95 % Доверительные Интервалы***
Относительная Чувствительность (Острая форма)	19/37*	51.4	34.9-67.8
Относительная Специфичность (Сероотрицательная)	28/28	100.0	89.4-100
Относительная Специфичность (Сероположительная)	86/91	94.5	89.7-99.3
<b>Относительная согласованность</b>	133/156	85.3	79.6-90.9

\* Сомнительные результаты не были включены в расчетах.

\*\* Сомнительные результаты не были протестированы повторно. Они оцениваются как неопределенные.

\*\*\* 95% доверительные интервалы были вычислены, используя обычный метод.

\*\*\*\* Серонегативный 95% доверительный интервал рассчитывается в предположении, что один результат ложно положительный.

Имейте в виду, что «относительный» относится к сравнению результатов этого анализа с аналогичным. Не было попытки соотнести результаты анализа с наличием или отсутствием болезней.

#### Точность

DAI EBNA-1 IgM ELISA оценивали на точность путем тестирования шести сывороток шесть раз каждая в одном месте и десять раз каждая в другом месте в течение трех разных дней. Результаты суммированы в таблице ниже.

#### Точность внутри анализа (N = 48)

Serum #	X	S.D.	C.V.
1	1.87	0.161	8.60%
2	1.56	0.166	10.63%
3	2.38	0.156	6.57%
4	1.30	0.132	10.18%
5	0.47	0.050	10.52%
6	0.19	0.051	26.36%
HPC*	3.28	0.146	4.45%
CAL**	2.22	0.144	6.48%
NC*	0.01	0.012	181.66%

X = Среднее значение ISR

SD = Стандартное Отклонение

CV = Коэффициент вариации

\*HPC и NC - n = 6

\*\*CAL - n = 18

#### Перекрестная реактивность

Сера, содержащая антитела, которые обнаруживаются ИФА, к Вирусу простого герпеса 1/2, Цитомегаловирусу и Вирусу ветряной оспы, была проанализирована. Также была проанализирована сыворотка, содержащая ревматоидный фактор (RF). Данные, суммированные ниже, показывают, что антитела к Varicella и сыворотки, содержащие РФ, не вступают в перекрестную реакцию с DAI EBNA-1 IgM ИФА. Может быть перекрестная реактивность с Вирусом простого герпеса и цитомегаловирусом.



**ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»