

НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К ВИРУСУ ЭПШТЕЙНА-БАРР

EIA-3476, Epstein Barr Virus (VCA) IgM ELISA

Каталог. № : EIA-3476
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 04-2012
Версия 10.0



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1. ВВЕДЕНИЕ

Набор иммуноферментного анализа **DRG Epstein Barr Virus (VCA) IgM** предоставляет материалы для качественного и полуквантитативного определения антител класса IgM к вирусу Эпштейна-Барр в сыворотке. Только для диагностического использования *in vitro*.

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор **DRG Epstein Barr Virus (VCA) IgM ELISA** является твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA).

Образцы пациентов разводятся разбавителем образца и дополнительно инкубируются с IgG-RF-сорбентом, содержащим гипер-иммунное анти-человеческое антитело класса IgG, чтобы избежать конкурентного ингибирования со стороны специфического IgG и удалить ревматоидные факторы. Эта предварительная подготовка позволяет избежать ошибочно отрицательных или ошибочно положительных результатов.

Микротитровальные лунки в твердой фазе покрыты инактивированной оболочкой антигена вируса Эпштейна-Барр.

Разбавленные образцы пациентов и готовые к использованию контроли пипетируются в эти лунки. Во время инкубации антитела, специфические для инактивированной оболочки антигена вируса Эпштейна-Барр положительные образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После этапа промывки, для удаления несвязанного образца и контрольного материала, в эти лунки добавляются анти-человеческие IgM антитела, конъюгированные пероксидазой хрена. Во время второй инкубации этот анти-IgM конъюгат связывается определенно с IgM антителами, в результате чего формируются энзим-связанные иммунные комплексы.

После второго этапа промывки для удаления несвязанного конъюгата, сформированные иммунные комплексы (в случае положительных результатов) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ, в результате чего образуется голубое окрашивание. Голубое окрашивание меняется на желтое при добавлении серной кислоты для остановки индикаторной реакции. Интенсивность этого окрашивания прямо пропорциональна количеству специфических IgM антител к оболочке антигена вируса Эпштейна-Барр в образце пациента. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA считывателе.

3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Данный набор предназначен только для использования в диагностике *in vitro*.
- Все реагенты этого набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, тестировались и подтверждены FDA методиками как отрицательные к ВИЧ 1/2, поверхностному антигену гепатита В и вирусу гепатита С. Однако, во время использования и уничтожения все реагенты следует рассматривать как потенциально биологически опасные.
- Контроли и стандарты в культурах клеток оказались неинфекционными.
- Избегайте контакта со стоп раствором, содержащим 0.5 моль/л H₂SO₄. Он может вызывать раздражение кожи и ожоги.
- Никогда не распыляйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не курите, не принимайте пищу, не пейте и не наносите косметику на территории, где обрабатываются образцы или реагенты набора.
- Надевайте одноразовые перчатки из латекса при обработке образцов и реагентов. Микробиологическое заражение реагентов или образцов может дать ошибочные результаты.

- Обращение должно соответствовать процедурам, указанным в соответствующих государственных руководствах или правилах по биологической безопасности.
- Не используйте реагенты после даты истечения срока годности, которая указана на этикетках набора.
- Согласно протокола анализа необходимо следовать всем рабочим объемам реагентов.
- Использование калиброванных пипеток и считывающих устройств пластины микротитратора. Оптимальные результаты анализа можно получить только при использовании откалиброванных дозаторов и микротитровальных планшеточных считывателей.
- Не смешивайте и не используйте компоненты наборов с различными номерами партий. Рекомендуется не заменять лунки различных планшетов, даже одной и той же партии. Возможно, что наборы поставлялись и хранились в различных условиях, и связывающие качества планшетов могут в некоторой степени отличаться.
- Исходя из соответствующих государственных руководств или правил по биологической безопасности, химические вещества, и подготовленные или использованные реагенты должны рассматриваться как опасные отходы.
- За информацией относительно опасных веществ, входящих в набор, просьба обращаться к Спецификациям Безопасности Материала. Спецификации Безопасности Материала предоставляются по запросу непосредственно от компании DRG Instruments GmbH.

4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

4.1 Содержимое набора

1. **Микротитровальные лунки** 12x8 (делимые) полоски, 96 лунок; Лунки покрыты оболочкой антигена вируса Эпштейна-Барр (вкл. 1 держатель для полосок и 1 пленку для накрытия).
2. **Раствор для разбавления образцов*****, 1 флакон, 100 мл, готов к использованию, желтого цвета; pH 7.2 ± 0.2. Содержит анти-человеческое антитело класса IgG.
3. **IgG-RF-сорбент*****, 1 флакон, 6,5 мл. Готовый к использованию; желтого цвета. Содержит анти-человеческие антитела класса IgG.
4. **Положительный контроль*****, 1 флакон, 1,0 мл готов к использ., желтого цвета, красный колпачок.
5. **Отрицательный контроль*****, 1 флакон, 2,0 мл, готов к использ., желтого цвета, желтый колпачок.
6. **Cut-off контроль*****, 1 флакон, 2,0 мл, готов к использ., желтого цвета, черный колпачок.
7. **Ферментный конъюгат*****, 1 флакон, 20 мл готов к использ., красного цвета, антитела к человеческому IgM, конъюгированные с пероксидазой хрена.
8. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл готов к использ., ТМБ.
9. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл готов к использ., содержит 0,2 моль/л H₂SO₄.
Избегайте контакта со стоп раствором. От может вызвать раздражения кожи и ожоги.
10. **Промывочный раствор***, 1 флакон, 30 мл (концентрация 20X для 600 мл); pH 6.5 ± 0.1 см. „Подготовка реагентов“.
*⇒ содержит безртутный консервант

4.1.1 Необходимые но не поставляемые материалы

- Микротитровальный планшеточный откалиброванный считыватель (450/620nm +/- 10nm).
- Откалиброванные микропипетки разного объема.
- Инкубатор на 37°C.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Вихревой трубочный смеситель.
- Деионизированная или (только что) дистиллированная вода.
- Таймер.
- Абсорбирующая бумага.

4.2 Хранение и стабильность набора

При температуре хранения от 2 до 8°C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. После истечения этой даты реагенты не использовать.

Открытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2-8°C. Как только пакет из фольги был открыт, следует быть внимательным чтобы его снова плотно закрыть.

Вскрытые наборы сохраняют активность в течение 4 месяцев при соблюдении вышеуказанных условий хранения.

4.3 Подготовка реагентов

Перед использованием приведите все реагенты и необходимое количество полосок к комнатной температуре.

Промывочный раствор

Разбавить промывочный раствор **1+19** (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий редистиллированной водой.

Потребление: ~5 мл на определение.

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °С на водяной бане. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 4 недель при 2+8°С.

4.4 Уничтожение набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с государственными правилами. Специальная информация о данном наборе представлена в Паспорте безопасности (см. Раздел 13 в данной инструкции).

4.5 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Сильно поврежденные отдельные компоненты не должны использоваться в анализе. Они должны храниться до достижения окончательного решения. После этого они должны быть уничтожены согласно официальным правилам.

5. ОБРАЗЦЫ

В данном исследовании может использоваться сыворотка. Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться и отделить центрифугированием сыворотку при комнатной температуре. Не центрифугировать пока не произошло полное свертывание. Для пациентов, проходящих антикоагуляционную терапию может потребоваться больше времени для свертывания.

5.2 Хранение образцов

Перед анализом образцы должны храниться накрытыми и могут храниться в течение 24 часов при температуре 2-8°С. Образцы, хранящиеся в течение более долгого срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20°С. Размороженные образцы перед исследованием необходимо несколько раз перевернуть.

5.3 Разбавление образцов

Перед анализом каждый образец пациента сначала следует разбавить раствором для *разбавления образцов*. Для абсорбции ревматоидного фактора эти предварительно разбавленные образцы затем должны инкубироваться вместе с *IgG-RF-сорбентом*.

1. Разбавить каждый образец пациента **1+50** раствором для разбавления образцов

напр., 10 мкл образца + 0,5 мл раствора для разбавления.

Хорошо смешать.

2. Разбавить этот предварительно разбавленный образец **1+1** IgG-RF-сорбентом

напр., 60 мкл предварительно разбавленного образца + 60 мкл IgG-RF-сорбента. **Хорошо смешать.**

3. **Оставить по крайней мере на 15 минут при КТ и хорошо перемешать снова (или на ночь при 2-8°С) и снова хорошо перемешать.**

4. Взять 100 мкл этих предварительно обработанных образцов для ИФА.

Внимание: Контроли готовы к использованию и их не надо разводить!

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- Внимательно прочитайте протокол перед выполнением анализа. Надежность результатов зависит от четкого следования описанному протоколу анализа.

- **Очень важно перед началом процедуры анализа все реагенты, образцы и контроли довести до комнатной температуры.**

- Как только начался анализ, все этапы должны быть завершены без прерывания.

- Во избежание перекрестного загрязнения, используйте новые одноразовые пластмассовые наконечники для каждого стандарта, контроля или образца.

- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, снять крышки, установить лунки в рамку и т.д. Это

обеспечит равномерное распределение времени для каждого этапа пипетирования без остановки.

- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

- Чтобы избежать испарения и микробиологического загрязнения, плотно закройте флаконы с реагентами непосредственно после их использования.

- После первого вскрытия и последующего хранения проверьте конъюгат и флаконы контролей на микробиологическое загрязнение для дальнейшего использования.

- Во избежание перекрестного загрязнения и ошибочно высоких результатов, раскапывайте образцы пациентов и распределяйте конъюгат на дно лунок аккуратно без разбрызгивания.

- Во время инкубации накрывайте микротитровальные полоски фольгой, чтобы избежать испарения.

6.2 Процедура анализа

Перед началом проведения анализа составьте тщательный для всех образцов и контролей **план распределения и идентификации**, вложенный в набор.

1. Отобрать требуемое количество микротитровальных полосок или лунок и поместить их в держатель.

Разместите по крайней мере:

- | | |
|------------------------|------------------------------|
| 1 лунку (напр., A1) | для бланка субстрата, |
| 1 лунку (напр., B1) | для отрицательного контроля, |
| 2 лунки (напр., C1+D1) | для Cut-off контроля и |
| 1 лунку (напр., E1) | для положительного контроля. |

На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.

2. Раскапать:

- | | |
|---------|---|
| 100 мкл | отрицательного контроля в лунку B1 |
| 100 мкл | Cut-off контроля в лунки C1 и D1 |
| 100 мкл | положительного контроля в лунку E1 и |
| 100 мкл | каждого предварительно обработанного образца |

новыми одноразовыми наконечниками в соответствующие. Оставить лунку A1 для бланка субстрата!

3. Накрыть лунки пленкой поставляемой в набор. Инкубировать: **60 минут при 37 °С.**

4. Резко вытряхните содержимое лунок.

Промойте их **5 раз** разбавленным *промывочным раствором (300 мкл/лунку)*. Резко вытряхните лунки на абсорбирующую бумагу, чтобы удалить остатки жидкости.

Примечание:

Чувствительность и точность данного анализа в значительной мере зависит от правильности исполнения процедуры промывки!

5. Раскапать **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки **кроме A1.**

6. Накрыть лунки пленкой. Инкубировать: **30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °С). Не подвергать воздействию прямого солнечного света!**

7. Резко вытряхните содержимое лунок.

Промойте их **5 раз** разбавленным *промывочным раствором (300 мкл/лунку)*. Резко вытряхните лунки на абсорбирующую бумагу, чтобы удалить остатки жидкости.

8. Добавить по **100 мкл раствора субстрата во все** лунки

9. Накрыть лунки фольгой. Инкубировать: **ровно 15 минут при комнатной температуре (20 ± 25 °С) в темноте.**

10. Остановить ферментную реакцию путем внесения **100 мкл стоп-раствора в каждую** лунку. Любое голубое окрашивание проявившееся во время инкубации переходит в желтое.

Примечание: высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!

11. Считать оптическую плотность при **450/620 нм** с помощью микровального планшетного считывателя в течении **30 минут** после внесения *стоп-раствора*.

6.3 Измерение

Настроить микропланшетный считыватель для ELISA на ноль используя **бланк субстрата в лунке A1.**

Если по техническим причинам ELISA считыватель не может быть настроен на ноль используя бланк субстрат в лунке A1, чтобы получить надежные результаты вычитайте значение абсорбции лунки A1 из всех остальных значений абсорбции.

Измерить абсорбцию во всех лунках при 450 нм и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в план.

Рекомендуется использовать для считывания двойную длину волны как референтную на 620 нм. Где применимо, **рассчитать средние значения абсорбции** всех дублей.

7. РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1 Оценка процесса анализа

Постановка анализа может считаться действительной при соблюдении следующих условий:

- *Бланк субстрата* в A1: ⇒ значение абсорбции менее 0.100.
- *Отриц. контроль* в B1: ⇒ значение абсорбции менее 0.200.
- *Cut-off контроль* в C1/D1: ⇒ значение абсорбции между 0.350-0,850.
- *Положит. контроль* in E1: ⇒ значение абсорбции более чем 0.650-3.000.

7.2 Вычисление

Среднее значение абсорбции "Cut-off" контроля [CO]
Рассчитать среднее значение абсорбции 2 определений Cut-off контроля (напр., в C1/D1).

Пример: $(0.49 + 0.51) \div 2 = 0.50 = CO$

7.3 Интерпретация

Средние значения абсорбции образцов пациента
более чем на 10 % больше CO
(Средняя ОП_{пациент} > 1.1 x CO)
ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ

(Средние) значения абсорбции пациентов
от 10 % выше до 10 % ниже CO
повторить анализ 2 - 4 недели спустя на новых образцах пациентов
($0,9 \times CO \leq \text{Средняя ОП}_{\text{пациент}} \leq 1.1 \times CO$)
СЕРАЯ ЗОНА

результат второго анализа опять
в «серой зоне»
ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ

(Средние) значения абсорбции пациента
более чем на 10 % ниже CO
(Средняя ОП_{пациент} < 0.9 x CO)
ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ

7.3.1 Результаты в DRG единицах [DU]

(Среднее) значение абсорбции пациента x 10
_____ = [Единицы DRG = ДЕ]

CO

1.580 x 10

Пример: _____ = 32 ДЕ

0.50

Интерпретация результатов

Значение Cut-off: 10 ДЕ
Серая зона: 9 - 11 ДЕ
Отрицательный: < 9 ДЕ
Положительный: > 11 ДЕ

8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно местному законодательству. Использование контрольных образцов рекомендуется для подтверждения достоверности результатов каждый день. Используйте контроли здоровых и патологических уровней.

Также рекомендуется заимствовать информацию из национальных или международных программ Подтверждения качества, для того чтобы быть уверенным в точности результатов.

Если результаты анализа вне принятых уровней контрольных материалов, их нужно считать не действительными.

В этом случае, пожалуйста, проверьте следующее: оборудование для раскапывания и установки времени; фотометр; даты истечения срока годности реагентов, условия хранения и инкубации; методы аспирации и промывания.

После проверки выше указанного и в случае если ошибка не была обнаружена, свяжитесь со своим дистрибьютором или производителем.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определяется как вероятность получения негативного результата при отсутствии специфического анализа.

Она составляет 98.3%.

9.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определяется как вероятность получения позитивного результата при присутствии специфического анализа.

Она составляет 100%.

10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Бактериологическое заражение или повторные циклы замораживания/размораживания образцов может повлиять на значения абсорбции. Только в иммунокомпромиссных пациентов и новорожденных серологические данные имеют ограниченные значения.

11. ЮРИДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Тест должен проводиться согласно инструкции производителя. Более того, потребитель должен точно соблюдать все правила профессиональной лабораторной практики или другие соответствующие национальные стандарты и/или законы. Это особенно относится к контрольным реагентам. В процессе проведения анализа важно включать достаточное количество контролей для оценки точности теста. Результаты теста действительны, только если они отвечают нормам и если все параметры теста отвечают спецификации теста. В случае любого сомнения свяжитесь с производителем.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения не должны базироваться только на результатах лабораторных исследований, даже если они считаются достоверными согласно п. 11.1. Любой результат является только частью общей клинической картины пациента.

Диагностика инфекционного заболевания не может устанавливаться только на основе единственного результата анализа. Точная диагностика должна учитывать всю клиническую картину пациента (историю, симптомы, сывороточные данные). Только в случаях, когда лабораторные результаты совпадают с нормами и общей картиной пациента, можно делать терапевтическое заключение.

Только результаты этого теста не могут быть основой для терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора и/или замена или компонентов разных лотов с одного набора или с другого может негативно влиять на результаты и весь тест. Такая замена не может быть основой для претензий или просьбы о замене набора.

Претензии в случаях неправильного использования набора лабораторией исходя из п. 11.2 тоже не могут являться действительными. Не смотря на это, в случае любой претензии, в производитель обязывается не повышать значения набора. Производитель не несет ответственности за любое повреждение набора, случившееся вследствие его неправильной транспортировки.



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
www.diameb.com

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»