

НАБОР ИФА
ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И
ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К ЯДЕРНОМУ
АНТИГЕНУ ТИПА 1 ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-
БАРР

EIA-4246, Epstein-Barr Virus (EBNA-1) IgG ELISA

Каталог. № : **EIA-4246**
Количество : **96**
Производитель: **DRG (Германия)**

Методика от **07-2012**
Версия **7.0**



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 для определения IgG антител к вирусу Эпштейна-Барр (EBNA-1) производства DRG включает материалы для качественного и полуколичественного определения антител IgG класса к вирусу Эпштейна-Барр Ядерный антиген в сыворотке. Тест система предназначена только для использования in-Vitro.

2 ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор для определения IgG-антител к вирусу Эпштейна-Барр ядерный антиген (DRG Epstein-Barr Virus (EBNA-1) IgG ELISA) использует метод твердофазного иммуноферментного анализа. Микротитровальные стрипованные лунки в качестве твердой фазы покрыты инактивированными ВЭБ ядерными антигенами.

Разведенные образцы пациента, а также **готовые к использованию** контроли пипетируются в лунки. Во время инкубации специфичные к ЭБНА-1 антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляется конъюгат антител IgG человека с меткой пероксидазы хрена. Во время второй инкубации этот конъюгат связывается специфически с антителами IgG, в результате чего формируются иммунные комплексы с ферментативными связями.

После второй промывки (для удаления несвязанного конъюгата) сформированные иммунные комплексы (в случае положительного результата) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ, в результате чего появляется голубое окрашивание. Голубое окрашивание меняется на желтое при добавлении серной кислоты для остановки индикаторной реакции.

Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител IgG специфичных к ВЭБ. Абсорбция считывается при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для диагностики in-Vitro!
- Все реагенты набора, содержащие человеческую сыворотку или плазму, были проверены на антитела ВИЧ-1/2, HCV, а также HBsAg. Результат отрицательный, но в целях безопасности необходимо обращаться с калибраторами и образцами пациентов осторожно, как с потенциально инфицированными.
- Контроли и Стандарты не инфицировали клеточных культур.
- Избегать контакта со Стоп-раствором, содержащим 0.5 M H₂SO₄. Может вызвать раздражение кожи и ожоги.
- Избегать попадания реагентов и образцов на кожу и слизистую оболочку.
- Не курить, не есть, не пить и не пользоваться косметикой в местах использования реагентов и образцов.
- При работе с образцами и реагентами надевать одноразовые резиновые перчатки. Бактериальное заражение реагентов или образцов может дать ошибочный результат.
- Использовать по назначению, в соответствии с государственными нормами и правилами по биологической безопасности.
- Не использовать реагенты, срок годности которых истек.
- Все указанные объемы необходимо соблюдать в соответствии с инструкцией. Оптимальные результаты анализа можно получить, используя только калибровочные пипетки.

- Не смешивать и не использовать компоненты из наборов разных лотов. Не рекомендуется использовать лунки других плашек, даже если лоты наборов одинаковые. Наборы могли хранить или перевозить в разных условиях, и связывающие характеристики плашек могут слегка отличаться.
- Обращаться с химическими реактивами и готовыми или использованными реагентами как с экологически опасными отходами.
- Сведения о безопасности материалов на эту продукцию можно запросить напрямую у компании DRG International, Inc. Сведения о безопасности материалов отвечают требованиям: EU-Guideline 91/155 EC.

4 МАТЕРИАЛЫ НАБОРА

4.1 Содержимое набора

1. **Микротитровальные лунки**, 12 x 8 (делимые) стрипы, 96 лунок;
Лунки покрыты ядерным антигеном ВЭБ. (вкл. 1 держатель для стрипов и 1 пленку для накрывания)
2. **Разбавитель образцов***, 1 флакон, 100 мл, готов к использованию, желтого цвета; pH 7,2 ± 0,2.
3. **Положительный контроль***, 1 флакон, 2 мл, готов к использованию, желтого цвета; красный колпачок.
4. **Отрицательный контроль***, 1 флакон, 2 мл, готов к использованию, желтого цвета; желтый колпачок.
5. **Cut-off контроль***, 1 флакон, 2 мл, готов к использованию, желтого цвета; черный колпачок.
6. **Ферментный конъюгат***, 1 флакон, 20 мл, готов к использованию, красного цвета, антитела к IgG человека конъюгированные с пероксидазой хрена.
7. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию, Тетраметилбензидин (ТМБ).
8. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл, готов к использованию содержит 0,2 Моль/л H₂SO₄. Избегать контакта со стоп-раствором. Может вызвать раздражение кожи и ожог.
9. **Промывочный раствор***, 1 флакон, 30 мл (20X концентрированный на 600 мл), pH 6.5±0,1 см. пункт «Приготовление реагентов».

*содержит не ртутный консервант

4.1.1 Дополнительное оборудование и материалы (не поставляется в наборе)

- Калиброванный микропланшетный ридер (450/620 нм ± 10 нм) (напр. микропланшетный ридер производства DRG Instruments)
- Калиброванные прецизионные микропипетки различной емкости
- Инкубатор 37 °C
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок
- Вортексная мешалка для пробиор
- Деионизированная или свежедистиллированная вода
- Таймер
- Впитывающая бумага

4.2 Хранение и стабильность набора

Реагенты стабильны до даты срока годности, указанной на этикетке при хранении их не вскрытыми при температуре 2 – 8 °C.

Не использовать реагенты после окончания срока годности! Открытые наборы хранить при 2-8 °C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2-8 °C. После использования необходимо плотно закрывать пакет с лунками. Открытые наборы стабильны в течение четырех месяцев при хранении в вышеуказанных условиях.

4.3 Приготовление реагентов

Довести реагенты и требуемое количество лунок до комнатной температуры.

Промывочный раствор

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

Потребление: **~5 мл** на определение

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °C на водяной бане. Убедитесь, что кристаллы полностью растворились перед использованием.

Стабильность после разведения: 4 недели при 2 ÷ 8 °C

4.4 Утилизация набора

Утилизация набора должна проводиться в соответствии с принятыми нормами. Специальная информация по данному продукту содержится в паспорте данных безопасности.

4.5 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, просьба проинформировать DRG® в письменной форме не позднее одной недели после получения набора. Не использовать для

постановки анализа отдельные серьезно поврежденные компоненты набора. Сохранять их до окончательного принятия решения. Затем утилизировать в соответствии с официальным законодательством.

5 ОБРАЗЦЫ

В этом испытании может использоваться сыворотка.

Не использовать гемолизированные, иктерические и липидные образцы.

Замечание: Не использовать образцы, содержащие азид натрия.

5.1 Забор образцов

Забрать кровь методом венепункции, дать свернуться, и отделить сыворотку посредством центрифугирования при комнатной температуре. Центрифугировать только после полного свертывания. Для свертывания крови пациентов, принимающих антикоагулянты, возможно, потребуется больше времени.

5.2 Хранение образцов

Образцы нужно накрыть и хранить до 24 часов при температуре от 2 до 8°C перед процедурой постановки анализа.

Для более длительного хранения, образцы необходимо заморозить при -20°C. Инвертировать размороженные образцы несколько раз перед процедурой постановки анализа

5.3 Разведение образцов

Развести каждый образец пациента **1+100** раствором для разведения образцов, напр., 10 мкл образца + 1 мл раствора для разведения (хорошо смешать, и оставить на 15 минут перед использованием).

Примечание: Контроли готовы к использованию и их не надо разводиться!

6 ПОСТАНОВКА АНАЛИЗА

6.1 Основные замечания

- **Очень важно довести все компоненты до комнатной температуры перед началом анализа!**
- Пошагово и, не прерываясь, выполнять процедуру постановки анализа.
- Во избежание кросс-контаминации, использовать новые пластиковые наконечники пипетки для каждого стандарта, контроля и образца.
- Абсорбция – это функция времени инкубации и температуры. Перед началом анализа, рекомендуется подготовить все реагенты, снять колпачки, установить в держателе необходимое количество лунок и т.д. Это позволит равномерно распределить время на пипетирование и не делать перерывов на данном этапе.
- Как общее правило, ферментная реакция прямо пропорциональна времени и температуре.
- Во избежание испарения и бактериального заражения плотно закрыть флаконы с реагентами сразу после использования.
- Перед повторным использованием и последующем хранением проверить флаконы с конъюгатами и контролями на бактериальное заражение.
- Во избежание кросс-контаминации и ложно завышенных результатов аккуратно пипетировать образцы пациента и вносить конъюгат на дно лунок.
- Во время инкубации накрыть стрипы фольгой во избежание испарения.

6.2 Процедура анализа

Перед проведением анализа необходимо развести *Промывочный раствор*, подготовить образцы пациента (см. раздел «Подготовка образцов»), тщательно перемешать перед пипетированием и составить схему распределения и идентификации образцов и контролей с помощью формы вложенной в набор.

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

Разместите по меньшей мере:

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

На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.

2. Пипетирование

- 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 разведенного образца пациента, используя новый наконечник, в оставшиеся лунки согласно схеме. Оставить лунку A1 для бланка субстрата!

3. Накрыть лунки пленкой поставляемой в наборе. Инкубировать **1 час при 37 °C**.
4. Удалить содержимое лунок и промыть их **5 раз** 300 мкл рабочего промывочного раствора. Резко выстучать содержимое лунок на абсорбирующую бумагу, чтобы удалить остатки жидкости.
Примечание: Чувствительность и точность данного анализа в значительной степени зависит от корректно проведенной 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 °C)**.
Не подвергать воздействию прямого солнечного света!
7. Резко вытряхнуть содержимое лунок. Промыть лунки **5 раз** 300 мкл рабочего промывочного раствора. Резко выстучать содержимое лунок на абсорбирующую бумагу, чтобы удалить остатки жидкости.
8. Добавить **100 мкл Субстрат раствора во все** лунки.
9. Накрыть лунки фольгой. Инкубировать **ровно 15 минут при комнатной температуре (20 - 25 °C) в темноте**.
10. Остановить ферментную реакцию, добавив **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. Считайте оптическую плотность при **450/620 нм** с помощью микропланшетного ридера **в течение 30 минут** после внесения *Стоп раствора*.

6.3 Измерение

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

Если по техническим причинам ELISA ридер не может быть настроен на ноль используя бланк субстрат в лунке A1, 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 схему.

Двойная длина волны – рекомендуется считывать на 620 нм как референтной длине волны. Где применимо - рассчитать среднее значение абсорбции всех дублей.

7 РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1 Оценка надежности результатов

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 **0.350-0.850**
- Положит. контроль** в E1 ⇒ значение абсорбции **0.650-3.000**

7.2 Подсчет

Среднее значение абсорбции отрицательного контроля [CO]

Рассчитать среднее значение абсорбции 2 определений Cut-off контролей (напр., в C1/D1).

Пример: $(0.44 + 0.46) \div 2 = 0.45 = CO$

7.3 Интерпретация

(Средние) значения абсорбции пациентов **более чем на 10 % больше CO** (Среднее OD_{пациента} >1.1xCO) ⇒ **положительный рез-т**

(Средние) значения абсорбции пациентов **от 10 % выше до 10 % ниже CO** ($0.9 \times CO \leq \text{Mean OD patient} \leq 1.1 \times CO$) ⇒ **серая зона ⇒ повторить анализ 2 - 4 недели спустя – на новых пробах пациентов**

результат второго анализа снова в «серой зоне» ⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

(Средние) значения абсорбции пациентов **более чем на 10 % ниже CO** (Mean OD patient < 0.9 x CO) ⇒ **отрицательный рез-т**

7.3.1 Результаты в Единицах ДРГ [ЕД]

Среднее значение абсорбции x 10 = [Единицы ДРГ= ЕД]
CO

Например: $\frac{1.580 \times 10}{0.45} = 35 \text{ ЕД}$

Интерпретация результатов

Значение *Cut-off*: 10 ЕД

Серая зона: 9-11 ЕД

Отрицательный: < 9 ЕД

Положительный: > 11 ЕД

8 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контроли согласно нормативной документации. Использование контролей рекомендуется проводить для подтверждения правильности проведения анализа. Используйте контроли для нормальных и патологических значений. Результаты по контрольным сывороткам для данного лота можно найти в прилагаемом с каждым набором листе контроля качества. Также рекомендуется участвовать в национальных программах по контролю качества ВСВОК. Если результаты анализа не соответствуют заявленным значениям, тест признается неверным. В этом случае проверьте оборудование, оцените правильность выполненных при анализе действий и условия среды, в которой проводился анализ, обратите внимание на процедуру мойки и аспирации. Если никаких нарушений вы не выявили, свяжитесь с представительством или напрямую с DRG®.

9 ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определяется возможностью тест системы показывать отрицательный результат при отсутствии специфичных аналитов. 100%.

9.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определяется возможностью тест-системы показывать положительный результат при наличии специфичного аналита. 98%.

10 ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Бактериальное заражение или повторное размораживание образцов могут влиять на результаты значений абсорбции.

Серологические данные пациентов с ослабленным иммунитетом и новорожденных имеют ограниченное диагностическое значение.

11 ПРАВОВАЯ ОСНОВА

Тест должен проводиться строго согласно инструкции производителя. Более того, пользователь должен быть знаком с правилами и стандартами GLP, а также с Российским законодательством в сфере лабораторной диагностики. Особенно, это важно с использованием контрольного материала. Важно использовать контроли во время теста, так как это свидетельствует о точности набора. Результаты теста приемлемы, только если показатели контроля в соответствующем допустимом интервале значений, а также все остальные данные вписываются в заявленные. При любых сомнительных результатах связывайтесь с представительством DRG®.

11.2 Терапевтические действия

Действия врача не должны базироваться лишь на одном виде диагностики, даже если эти результаты достоверны и совпадают с контрольными. Любой лабораторный результат лишь дополняет клиническую картину пациента. Врач должен принимать только достоверные результаты лабораторных исследований. Сам по себе результат не может служить основанием для постановки диагноза.

11.3 Ответственность

Любая модификация теста и/или обмен, или смешивание компонентов из одного набора в другой разных лотов может негативно отразиться на результатах тестов. Такие рекламации не рассматриваются.

Рекламации по ошибкам потребителя также не рассматриваются.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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