

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К ЯДЕРНОМУ АНТИГЕНУ 1 ТИПА ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР (EBNA-1)

## EIA-4247, Epstein-Barr Virus (EBNA-1) IgM ELISA

Кат. № : EIA-4247  
Количество : 96  
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 07-2012  
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 (EBNA-1) IgM предоставляет материалы для **качественного** и **полуколичественного** определения антител класса IgM к ядерному антигену тип 1 вируса Эпштейна-Барр в сыворотке.

**Данный анализ предназначен только для диагностического использования *in vitro*.**

### 2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG Epstein Barr Virus (EBNA-1) IgM ELISA является твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA).

Образцы пациентов разводятся разбавителем образца и дополнительно инкубируются с IgG-RF-сорбентом, содержащим гипериммунное 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 фазы покрыты рекомбинантом ядерного антигена тип 1 вируса Эпштейна-Барр.

**Разбавленные образцы пациентов и готовые к использованию контроли** пипетируются в эти лунки. Во время инкубации специфичные к EBNA-1 антитела положительных 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 к вирусу Эпштейна-Барр, конъюгированные пероксидазой хрена. Во время второй инкубации этот анти-IgM конъюгат связывается только с IgM антителами, в результате чего формируются энзимсвязанные 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 в образце EBNA-1 специфического IgM антитела в образце пациента. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA считывателе.

### 3. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Данный набор предназначен только для *in vitro* диагностики и профессионального использования.
- Все реагенты этого набора, которые содержат сыворотку или плазму человека, были протестированы и показали отрицательный результат на HIV I/II, HBsAg and HCV по методам одобренным FDA. Однако, не существует методов, гарантирующих полное отсутствие этих веществ. Поэтому, все продукты человеческой крови, включая образцы сыворотки, должны считаться потенциально опасными.
- Перед началом исследования прочитайте инструкцию полностью и внимательно. Используйте действительную версию инструкции, приложенную к набору. Убедитесь, что вам все понятно.
- Микротитровальная плашка содержит делимые стрипы. Неиспользованные лунки должны храниться при 2 °C - 8 °C в пакете из фольги и использоваться с поставляемой рамкой.
- Пипетирование образцов и реагентов должно осуществляться как можно быстрее и с одинаковыми временными интервалами.

- Используйте резервуары только для одного компонента. Это особенно важно для резервуаров с субстратом. Использование для разлива субстрата емкости, которая прежде использовалась для раствора конъюгата, может привести к изменению цвета раствора. Не сливайте реагенты обратно во флаконы, так это может привести к контаминации реагентов.
- Для получения достоверных результатов тщательно перемешивайте содержимое лунок. Не используйте лунки повторно.
- Не позволяйте лункам высохнуть во время анализа; добавляйте реагенты сразу после промывки.
- Перед анализом доведите все компоненты до комнатной температуры (21-26°C). Температура влияет на показания абсорбции. Тем не менее, не будет влияния на образцы пациентов.
- Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
- Нельзя есть, пить, курить или наносить косметику в месте работы с реагентами.
- Надевайте одноразовые перчатки при раскапывании образцов и реагентов.
- Работа с реагентами должна проводиться в соответствии с процедурами, утвержденными соответствующим управлением биологической безопасности и регулирования.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Все указанные объемы должны соблюдаться в соответствии с инструкцией. Оптимальные результаты возможны только при использовании калибровочных пипеток и микропланшетного ридера.
- Не смешивайте и не используйте компоненты из различных лотов. Рекомендуется не менять лунки разных плашек даже одного лота. Наборы могут транспортироваться или храниться в разных условиях и в результате характеристики связывания у плашек могут отличаться.
- Избегайте контакта со стоп раствором – 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1M HCL. Это может вызвать раздражения кожи или ожоги.
- Некоторые реагенты содержат Проклин 300, БНД и/или МИТ в качестве консервантов. В случае их контакта с глазами или кожей, промойте этот участок водой.
- Раствор субстрата ТМБ оказывает раздражающий эффект на кожу и слизистые. В случае контакта, промойте глаза с большим объемом воды и кожу с мылом и большим количеством воды. Промойте загрязненные объекты перед повторным использованием. В случае вдыхания реагентов, выведите человека на свежий воздух.
- Химикаты и готовые и использованные реагенты должны быть утилизированы как биологически опасные в соответствии с региональными нормами.
- Информацию об опасных реагентах, используемых в этом наборе, вы можете найти в Паспорте безопасности. Он также доступен по запросу в DRG.

### 4. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

#### 4.1 Содержимое набора

1. **Микротитровальные лунки** 12x8 (делимые) полоски, 96 лунок; Лунки покрыты рекомбинантом EBNA-1 (вкл. 1 держатель для полосок и 1 пленку для накрывания).
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 Готов к использованию; желтого цвета. Содержит анти-человеческое антитело 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
*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 не ртутный консервант

#### 4.1.1 Необходимые, но не поставляемые материалы

- Микротитровальный планшетный откалиброванный считыватель (450/620нм +/- 10нм).
- 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.
- Промокательная 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 °C на водяной бане. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 4 недель при 2+8°C.

#### 4.4 Уничтожение набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с государственными правилами. Специальная информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности.

#### 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. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В данном исследовании может использоваться сыворотка.

Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

#### 5.1 Забор образцов

Забрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette для сыворотки), 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°C. Образцы, хранящиеся в течение более долгого срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20°C. 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°C, 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 необходимо разбавить промывочный раствор, **приготовьте образцы пациентов как описано в п. 5.3** и осторожно составьте 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 разбавленного образца новыми одноразовыми наконечниками в соответствующие лунки. Оставить лунку A1 для бланка субстрата!
3. Накрыть лунки пленкой поставляемой в наборе. Инкубировать: **60 минут при 37 °C**.
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 °C)**. *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 °C) 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 микротитровального планшетного считывателя в течении **30 минут** после внесения **стоп-раствора**.

### 6.3 Измерение

**Настроить** микропланшетный считыватель для ELISA на нуль используя **бланк субстрата в лунке А1**.

Если по техническим причинам ELISA считыватель не может быть настроен на нуль используя бланк субстрат в лунке А1. Чтобы получить надежные результаты вычитайте значение абсорбции лунки А1 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 А1:** ⇒ значение абсорбции менее **0,100**.
- **Отриц. контроль в В1:** ⇒ значение абсорбции менее **0,200**.
- **Cut-off контроль в С1/D1:** ⇒ значение абсорбции между **0,350-0,850**.
- **Положит. контроль in E1:** ⇒ значение абсорбции более **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 С1/D1).

**Пример:**  $(0,54 + 0,56) \div 2 = 0,55 = CO$

### 7.3 Интерпретация

Средние значения абсорбции образцов пациента более чем на 10 % больше CO  
(Средняя ОП<sub>пациент</sub> > 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 x CO ≤ Средняя ОП<sub>пациент</sub> ≤ 1,1 x CO)  
**СЕРАЯ ЗОНА**

**результат второго анализа опять в «серой зоне»**  
**ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ**

(Средние) значения абсорбции пациента более чем на 10 % ниже CO  
(Средняя ОП<sub>пациент</sub> < 0,9 x CO)  
**ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ**

#### 7.3.1 Результаты в DRG единицах [DU]

(Среднее) значение абсорбции пациента x 10  
————— = [DRG единицы = DU]  
CO

Пример:  $\frac{1,580 \times 10}{0,55} = 29 DU$

#### Интерпретация результатов

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

## 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 случаи, пожалуйста, проверите следующее: оборудование для распаковывания 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 аналита. Она составляет 97%.

### 9.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определяется как вероятность получения позитивного результата при присутствии специфического аналита. Она составляет 95%.

## 10. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Бактериологическое заражение или повторные циклы замораживания/размораживания образцов может повлиять на значения абсорбции. Только в иммунокомпромисных 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, производитель обязывается не повышать значения набора. Производитель не несет ответственности за любое повреждение набора, случившееся вследствие его неправильной транспортировки.



**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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»