



Набор ИФА для определения антител класса IgG к раннему антигену вируса Эпштейна-Барра

Кат. № : EIA-2796
Количество : 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 23-07-2007

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке

НАЗНАЧЕНИЕ

DRG EBV-EA IgG ELISA набор – тестовая система, используемая как способ определения антител класса IgG к вирусу Эпштейна-Бара (EBV) раннего антигена (EA) в человеческой сыворотке. Тестовая система предназначена как метод диагноза инфекционного мононуклеоза (IM) при использовании с другими серологическими EBV методиками. Рабочие характеристики не были определены как метод точного диагноза IM.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Процедура анализа включает три этапа инкубации:

1. Тестовые сыворотки (соответственно разбавленную) инкубируются в микролунках. Покрытык инaktivированным EBV-EA в человеческих сыворотках. Специфические IgG антитела в образце привязываются к иммобилизованному антигену. Планшет промывается для удаления несвязанного антитела и другие компоненты сыворотки.
2. Коньюгированный пероксидазой козляный анти-человеческий IgG (γ цепь специфический) вносится в лунки и планшет инкубируется. Коньюгат реагирует с IgG антителом, иммобилизованным на в твердой фазе этапа 1. Для удаления не вступившего в реакцию коньюгата промываются лунки.
3. Микролунки, содержащие коньюгат иммобилизированной пероксидазы, инкубируются с субстратным раствором пероксидазы. Гидролиз субстрата за посредством пероксидазы образует изменение цвета. После некоторого времени реакция останавливается и интенсивность цвета раствора измеряется фотометрическим способом. Интенсивность цвета набора зависит от концентрации антител в тестовом образце.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Все реагенты содержат азид натрия как консервант в концентрации 0,1%.

1. **Микропланшет:** 96 лунок, состоящий из двенадцати 1x8 полосок, покрытых инaktivированным EBV ранним антигеном. Полоски в держателе запечатаны в пакете с осушителем.
2. **Коньюгат:** 15 мл/фл. Коньюгированный HRP козляный анти-человеческий IgG (γ цепь специфический). Готов к употреблению, с белым колпачком. Добавлены консерванты.
3. **Положительный контроль (человеческая сыворотка):** 1 фл. 0,35 мл с красным колпачком. Добавлены консерванты.
4. **Калибратор (человеческая сыворотка):** 1 фл. 0,5 мл с синим колпачком. Добавлены консерванты.
5. **Отрицательный контроль (человеческая сыворотка):** 1 фл. 0,35 мл с зеленым колпачком. Добавлены консерванты.
6. **Разбавитель образца:** 1 бут. 30 мл (зеленая крышка) содержащая Tween-20, бычий альбумин сыворотки и фосфат-буферизованный раствор, (pH 7,2 +/- 0,2). Зеленый раствор, готов к использованию.
Примечание: перед использованием хорошо встряхните. Добавлены консерванты. Разбавитель образца в присутствии сыворотки меняет цвет.
7. **ТМВ:** 1 бут. 15 мл (янтарная крышка). Раствор содержит ТМВ. Готов к использованию. Содержит DMSO \leq 15%.
8. **Стоп раствор:** 1 бут. 15 мл (красный колпачок). Содержит 1M серной кислоты, 0,7M HCl. Готов к использованию.
9. **Концентра промывочного раствора (10x):** разбавьте 1 часть концентрата + 9 частей деионизированной или дистиллированной воды. 1 бут. 100 мл (прозрачный колпачок), содержащая 10x концентрат фосфат буферизованного раствора и раствора Tween-20 (синий раствор). Содержит консервант. **Примечание:** 1x раствор с уровнем pH 7,2 +/- 0,2.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты для диагностики in vitro.
2. Не используйте набор или реагенты после истечения срока пригодности. Не смешивайте реагенты разных лотов.
3. Процедуру следует проводить осторожно для получения надежных результатов и клинической интерпретации.
4. Приведите все реагенты к комнатной температуре, по крайней мере, за 60 минут до проведения анализа.
5. Избегайте загрязнения реагентов при заборе их из флаконов.. Мы рекомендуем использовать автоматические пипетки с сменными наконечниками. При внесении реагентов, не дотрагивайтесь к стенкам ячеек для предотвращения перекрестного загрязнения.
6. Для этапа промывания используйте только мощный раствор, что поставляется в данном наборе и тщательно следуйте инструкции в пункте «Инструкция для промывания». В любом случае используйте микропланшетный промыватель высокого качества.
7. Не допускайте контакта субстрата/ хромогена с окисляющими агентами или металлической поверхностью: не допускайте сильного освещения во время инкубации или приготовления реагентов. При приготовлении хромоген/субстрата рекомендуется использовать сменный пластиковые стерильные контейнеры.
8. Обращайтесь со всеми реагентами как с потенциально инфицированными. Все объекты, что были в контакте с образцами должны быть обработаны как потенциально инфицированные. Наилучшей процедурой инактивации является обработка автоклавом при 121°C 30 минут или гипохлоридом натрия 2,5% 24 часа. Этот последний метод может использоваться для обработки жидкости, что была нейтрализована перед этим гипохлоридом натрия.
9. Избегайте контакта с кожей и слизистыми, особенно блокирующих реагентов.
10. В любом случае используйте защитные перчатки.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

1. ELISA микропланшетный считыватель, способен считать при длине волны 450.
2. Точные микропипетки на 10 и 200 мкл.
3. Точная многоканальная пипетка (50-200 мкл).
4. Емкости реагентов для многоканальных пипеток.
5. Промывочная бутылка или система помывки планшета.
6. Дистиллированная или неионизированная вода.
7. Хронометр.
8. Градуированный цилиндробразная емкость объемом 1 литр.
9. Серологические пипетки.
10. Одноразовые наконечники для пипеток.
11. Бумажные полотенца.
12. Лабораторный таймер для отслеживания этапов инкубации.
13. Инкубатор при 37°C.
14. одноразовая емкость и дезинфицирующее средство (раствор 10% отбеливателя, 0,5 % гипохлорита натрия).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

1. Хранить неоткрытый набор между 2-8°C.
2. Покрытые микропланшетные полоски: хранить между 2-8°C. Оставшиеся полоски необходимо немедленно запечатать с осушителем и вернуть в прежние условия хранения. Полоски стабильны в течении 60 дней после вскрытия и правильного запечатывания пакета и индикатор остается синим.
3. Коньюгат: хранить между 2-8°C. Не замораживать.
4. калибратор, положительный контроль и отрицательный контроль: хранить между 2-8°C.
5. ТМВ: Хранить между 2-8°C.
6. Концентрат промывочного буфера (10x): Хранить при 2 и 25°C. Разбавленный промывочный буфер (1x) стабилен при комнатной температуре (20-25°C) до 7 дней или до 30 дней между 2-8°C.
7. Разбавитель образца: хранить между 2-8°C.
8. Стоп раствор: хранить между 2-25°C.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦА

Можно использовать только свежую сыворотку или плазму. Хранить при комнатной температуре не более 8 часов. Если не используется в течении 8 часов, может храниться при 2-8°C не более 48 часов; при более длительном хранении заморозить до -20°C или ниже. Избегайте повторных циклов замораживания/размораживания, поскольку это может привести к потере активности антител и предоставить ошибочные результаты.

ОБЩАЯ ПРОЦЕДУРА

1. Приведите компоненты набора к комнатной температуре (20-25°).
2. Определите требуемое количество микролунок. Проведите шесть определений контролей/калибраторов (1 бланк, 1 отриц. контроль, 3 калибратора и 1 положительный контроль) на одну процедуру. Бланковый реагент должен использоваться в каждом анализе. Проверьте ПО и требования считывателя для правильных конфигураций контролей/калибраторов. Верните неиспользованные полоски в самозапечатывающийся пакет с осушителем, закройте и верните для хранения при 2-8°С.

Пример схемы планшета		
	1	2
A	Бланк	Пациент 3
B	Отриц. контроль	Пациент 4
C	Калибратор	и т.д.
D	Калибратор	
E	Калибратор	
F	Полож. контроль	
G	Пациент 1	
H	Пациент 2	

3. Приготовьте разбавление 1:21 (пример: 10 мкл сыворотки+200 мкл разбавителя образца. Примечание: Хорошо встряхните перед использованием) отриц. контроля, калибратора, полож. контроля и каждого образца сыворотки.
4. В отдельные лунки внесите 100 мкл каждого разбавленного контроля, калибратора и образца. Убедитесь, что образцы перемешаны правильно. Используйте индивидуальные наконечники пипетки для каждого образца.
5. Добавьте 100 мкл разбавителя образца в лунку A1 как бланк реагента. Проверьте ПО и требования считывателя для правильной конфигурации лунки бланка реагента.
6. Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25°С) в течении 25 +/- 5 минут.
7. Промойте микролуночные полоски 5X.

А. Ручная процедура промывки:

- а) Сильно встряхните жидкость из лунок
- б) Заполните каждую лунку промывочным буфером. Убедитесь об отсутствии в лунках воздушных пузырей.
- в) Повторите этапы а) и в), чтобы в сумме получилось пять промывок.
- г) Встряхните промывочный раствор из всех лунок. Переверните планшет на бумажное полотенце и жестко постучите по нему, чтобы удалить остаток промывочного раствора из лунок. Осмотрите планшет и убедитесь об отсутствии остатков промывочного раствора. Соберите промывочный раствор в одноразовую емкость и обработайте 0,5 % гипохлоритом натрия (отбеливателем) в конце каждого рабочего дня.

В. Автоматизированная процедура промывки

При использовании автоматизированной промывочной системы, настройте объем распределения на 300-350 мкл/лунку. Настройте промывочный цикл на 5 промывок без задержки между промывками. При необходимости удалите микропланшет из промывателя, переверните на бумажное полотенце и встряхните остатки промывочного раствора из микролунок.

8. Добавьте 100 мкл 1X раствора конъюгата в каждую лунку через ровные интервалы времени в том же порядке что и образцы.
9. Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25°С) в течении 25 +/- 5 минут.
10. Повторите промывание как описано в шаге 7.
11. Добавьте 100 мкл ТМВ, включая бланк реагента в одинаковые периоды времени и в том же порядке как добавлялись образцы.
12. Инкубируйте 10 +/- 5 минут при комнатной температуре (20-25°С).
13. Остановите реакцию добавлением 50 мкл стоп раствора в каждую лунку, включая ячейку бланка реагента в одинаковые периоды времени и в том же порядке как добавлялись образцы. Положительные образцы из синего цвета станут желтыми. После добавления стоп раствора постучите по планшету несколько раз. Чтобы убедиться, что образцы тщательно перемешаны.
14. Настройте микропланшетный считыватель на его считывание при длине 450 нм и измерьте оптическую плотность (ОП) каждой лунки по отношению к бланку реагента. Считывание необходимо провести в течении 30 минут после добавления стоп раствора.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. во время каждой процедуры анализа, низко положительный стандарт (НПС) необходимо анализировать трижды. Высоко положительный и отрицательный контроли необходимо также включать в каждый анализ.
2. определите среднее значение трех низко положительных определений. Если любое из значений НПС отличается на более

чем 15% от среднего, вычтите это значение и вычислите среднее из остающихся двух значений.

3. Средне значение ОП для НПС и значения ОП для высоко положительных и отрицательных контролей должно находиться в следующих пределах:

	Диапазон ОП
Отрицательный контроль	≤ 0.250
Калибратор	≥ 0.300
Положительный контроль	≥ 0.500

- а) ОП отрицательного контроля разделенная на среднюю ОП НПС должна составлять ≤ 0.9 .
 - б) ОП положительного контроля разделенная на среднюю ОП калибратора должна составлять $\geq 1,25$.
 - в) Если условия тестирования не соответствуют вышеуказанным показателям, тест следует считать недействительным и его следует повторить.
4. Положительный и отрицательный контроли предназначены для мониторинга вещественного отклонения реагента и не гарантирует точностьна уровне cut-off анализа.
 5. Дополнительные контроли могут тестироваться в соответствии с указаниями или требованиями региональных, государственных, и/или федеральных законов или аккредитированных учреждений.
 6. Следуйте документу NCCLS C24: «Статистический контроль качества для количественного измерения» относительно практики контроля качества.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**РАСЧЕТЫ****1. Фактор коррекции:**

Значение ОП cut-off для положительных образцов определено производителем и соответствует калибратору. Фактор коррекции (ФК) дает возможность определять значение cut-off для положительных образцов и исправлять небольшие вариации в повседневных результатах тестов. Фактор коррекции определен для каждой новой партии компонентов набора и печатается на вкладыше, находящимся в в коробке набора.

2. Значение ОП cut-off:

Для получения значения cut-off умножьте ФК на среднюю ОП вышеуказанного калибратора.

(ФК x средн. ОП определенного Вами НПС = ОП cut-off)

3. Указательные значения или коэффициенты ОП:

Вычислите указательное значение или коэффициент ОП для каждого образца, разделив его значение ОП на ОП cut-off этапа 2.

Пример:

Средняя ОП калибратора	= 0,793
Фактор коррекции (ФК)	= 0,25
ОП cut-off	= 0,793 x 0,25=0,198
ОП неизвестного образца	= 0,432
Коэфф.-ное значение образца о коэфф. ОП	= 0,432 / 0,198 = 2,18

ИНТЕРПРЕТАЦИИ

Коэффициентные значения или коэффициенты ОП интерпретируются следующим образом:

	Коэффициентные значения или коэффициент ОП
Отрицательные образцы	≤ 0.90
Сомнительные образцы	0.91 – 1.09
Положительные образцы	≥ 1.10

1. Коэффициент ОП ≤ 0.90 не указывает на определение IgG антител к EBV-EA.
2. Коэффициент ОП ≥ 1.10 указывает на реакцию IgG к EBV-EA.
3. Образцы со значениями коэффициента ОП в сомнительном диапазоне (0.91 – 1.09) должны тестироваться повторно. Образцы, остающиеся сомнительными после повторного тестирования должны тестироваться с помощью другой серологической процедуры, которой является непрямая флуоресцентная процедура тестирования антитела (IFA) компании DRG.

ОГРАНИЧЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Диагноз должен основываться не только на результатах анти-EBV-EA. Результаты для анти-EBV-EA должны интерпретироваться в сочетании с клинической оценкой и результатами других диагностических процедур.
2. Этот тест определяет оба R и D компонентов EA. Тестовая система не создан для дифференциации антител по отношению к R и D компонентам.
3. Необходимо избегать использования гемолизированных, липемических, бактериологически зараженных или инaktivированных теплом образцов. Могут быть получены ошибочные результаты.
4. Диагноз необходимо делать отдельно на основании результатов анти-EA. Результаты VCA и EBV-NA должны приниматься во внимание при оценке образцов пациентов на серологическое состояние EBV.
5. Рабочие характеристики анализа не созданы для других матриц кроме сыворотки.
6. Величина полученных результатов выше cut-off не указывает на общее количество присутствующих антител и не может соотноситься с IFA титрами.
7. Рабочие характеристики анализа не созданы для визуальных определений результата.
8. Необходимо соблюдать осторожность во время оценки образцов от иммунодепрессивных документов.
9. Преобладание аналита влияет на упреждающее качество анализа.
10. Рабочие характеристики данного анализа не созданы для лимфомы Буркитта, назофарингеальной карциномы и лимфопрлиферирующих расстройств. Рабочие характеристики были установлены для диагноза EBV-сопутствующего инфекционного мононуклеоза.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения или оценки уровня ожидаемых реактивности в двух клиниках было проанализировано 250 образцов. Было представлено две группы образцов: 150 клинических образцов, которые были отправлены в лабораторию для обычного серологического EBV анализа, и 100 выборочных нормальных донорских образцов. По отношению к клиническим образцам 43/150 (28,7%) были положительными, 101/150 (67,3%) был отрицательными, и 6/150 (4,0%) были сомнительными. По отношению к нормальным образцам, 18/100 (18%) были положительными, 76/100 (76%) были отрицательными, и 6/100 (6%) были сомнительными.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сравнительное исследование:

Сравнительное исследование было проведено для демонстрации равноценности тестовой системы DRG EBV-EA IgG ELISA к другой коммерчески предлагаемой тестовой системе (Пример 1) при оценке образцов, предназначенных для диагноза ИМ (инфекционного мононуклеоза).

Эффективность тестовой системы DRG EBV-EA IgG ELISA была оценена в трехстороннем клиническом исследовании. Вкратце, было протестировано в общем количестве 273 образца: 125 в одном месте, 125 в другом месте, и 23 в третьем месте. Клинические образцы, тестированные в месте 1 и 2 состояли из комплекса обычных образцов, которые были отправлены в контрольную лабораторию для обычного серологического EBV анализа, и из обычных образцов доноров. Хранящиеся образцы были протестированы в месте 3. Они уже прежде тестировались и были определены положительными на антитела к EBV-EA. Сомнительные образцы были исключены из дальнейшего анализа. Таблица 1 ниже показывает результаты из места 1, таблица 2 демонстрирует результаты места 2. Результаты места 3 не указаны отдельно, но включены в таблице 3, в которой сведены результаты всех 3 мест клинического исследования.

		DRG EBV-EA IgG ELISA результат			
		+	-	+/-	Общие
Образец 1	+	22	9	2	33
DRG EBV-EA IgG	-	2	73	3	78
Тестовая система	+/-	5	5	4	14
Общие		29	87	9	125

Относительная чувствительность = $22/31 = 71\%$ (95% доверительный интервал* = 55 до 87%)

Относительная чувствительность = $73/75 = 97\%$ (95% доверительный интервал* = 94 до 100%)

Относительное совпадение = $95/106 = 90\%$ (95% доверительный интервал* = 84 до 95%)

*95% доверительные интервалы вычисляются при использовании определенного метода.

Таблица 2: Вычисление относительной чувствительности,

		DRG EBV-EA IgG ELISA результат			
		+	-	+/-	Общие
Образец 1	+	25	6	4	35
DRG EBV-EA IgG	-	7	83	0	90
Тестовая система	+/-	0	0	0	0
Общие		32	89	4	125

специфичности и совпадения; исследование места 2

Относительная чувствительность = $25/31 = 81\%$ (95% доверительный интервал* = 67 до 94%)

Относительная чувствительность = $83/90 = 92\%$ (95% доверительный интервал* = 87 до 98%)

Относительное совпадение = $108/121 = 89\%$ (95% доверительный интервал* = 84 до 95%)

*95% доверительные интервалы вычисляются при использовании определенного метода.

Таблица 3: Вычисление относительной чувствительности, специфичности и совпадения; Комбинация всех 3 мест исследований

		DRG EBV-EA IgG ELISA результат			
		+	-	+/-	Общие
Образец 1	+	67	15	7	89
DRG EBV-EA IgG	-	11	156	3	170
Тестовая система	+/-	5	5	4	14
Общие		83	176	14	273

исследований

Относительная чувствительность = $67/82 = 82\%$ (95% доверительный интервал* = 67 до 94%)

Относительная чувствительность = $156/167 = 93\%$ (95% доверительный интервал* = 90 до 97%)

Относительное совпадение = $223/249 = 90\%$ (95% доверительный интервал* = 86 до 93%)

*95% доверительные интервалы вычисляются при использовании определенного метода.

В таблице 3 выше обнаружено в общей сумме 26 расхождений в образцах. 11/273 (4,0%) образцов оказались ELISA положительными и отрицательными, следуя образцу 1. В общем количестве 15/273 (5,6%) образцов были ELISA отрицательными и положительными, следуя образцу 1. В группе из 15 образцов, 1/15 имели титр конечной точки образца 1 1:160, 4/15 образцов имели титр конечной точки 1:120, и остальные (10/15) имели титр конечной точки образца 1 1:10.

Примечание: примите во внимание, что относительность ссылается на сравнение результатов данного анализа с подобным анализом. Не было предпринято попыток коррекции результатов анализа по отношению к наличию или отсутствию болезни. Нет возможности сравнить точность анализа для упреждения болезни.

Все 273 образца тестированы в процессе клинического исследования также были тестированы на EBV-VCA IgG, EBV-VCA IgM, EBNA-1 IgG и гетерофильное антитело. Результаты этого вспомогательного тестирования отображены в таблице 1.

Таблица 1: Результаты EBV-EA IgG ELISA по серологическому состоянию категории EBV (см. в оригинале инструкции на стр. 10).

ВОССТАНОВЛЕНИЕ

Исследования восстановления были проведены в обеих местах при использовании одинаковых образцов. Вкратце, протестировано 6 образцов, два относительно сильно положительных, два образца близкие к cut-off, и два полностью отрицательных. Кроме того, отрицательный контроль и высоко положительный контроль набора были включены как дополнительные компоненты панели в месте 1, в общем количестве 8 образцов. В каждый день тестирования каждый их 8 образцов анализировался в шести репликатах лунок. Тестирование проводилось в течении 3 дней в каждом месте. Итог этого исследования подан ниже в таблице 5: (см. в оригинале инструкции на стр. 10).

ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

Было проведено исследование для изучения возможности перекрестной реактивности с другими вирусами. В данном исследовании были оценены 10 образцов. Двое из образцов оказались сильно реактивными к *Rubella*, два к *Rubeola*, два к

HSV-1, два к HSV-2 и два к CMV. Ни один из 10 образцов не оказался реактивным в тестовой системе DRG анти-EBV-EA IgG ELISA, указывая на небольшую вероятность перекрестной реактивности с такими образцами пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua