



**Набор ИФА
для определения антител класса IgG к
капсульному антигену
ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРРА**

Кат. номер : 1405Z
Количество : 96
Производитель : DAI (США)

Методика от 10-10-2009

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

Анализ	EBV VCA IgG ELISA
Метод	Иммуносорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Непрямой ИФА; покрытый антигеном планшет
Диапазон обнаружения	Качественный - положительный; отрицательный контроль и пороговое значение (cut-off)
Образец	5 мкл сыворотки
Специфичность	100 %
Чувствительность	100 %
Общее время	~ 90 мин.
Срок годности	12-18 мес.

НАЗВАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для количественного определения IgG антитела к вирусу Эпштейна-Барра в сыворотке человека. Одиночный образец сыворотки используется для определения предварительной инфекции или иммунного статуса вируса Эпштейна-Барра.

ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение Эпштейн-Барра вируса было впервые описано в 1964 году Эпштейном, Аконгом и Барром при использовании микроскопического изучения культуры лимфоцита, полученной для пациента с лимфомой Буркитта. EBV классифицируется к герпесным вирусам, основываясь на его морфологической характеристике.

EBV инфекция демонстрирует широкий спектр клинических симптомов. EBV инфекция передается через слюну, возникает в детстве и протекает бессимптомно. В США 50% населения демонстрирует антитела EBV до 5 лет; 80% при совершеннолетия. Также отмечены инфекции EBV ассоциированные с переливанием. В молодости, инфекция EBV может быть клинически выражена как инфекция мононуклеоза с типичными симптомами заболевания горла, лихорадкой и лимфоденопатией. Студенты колледжа и военные часто упоминаются как высокозаболеваемая часть населения на мононуклеоз.

После первичной инфекции EBV, предполагается, что В лимфоциты могут содержать EBV геном и представлять скрытую инфекцию, что продолжается всю жизнь. Реактивация EBV инфекции или усиленная активность инфекции замечена в иммуносупрессивных пациентов или при иммунодефиците, при пересадке органов, опухоли, беременных женщин и особ преклонного возраста.

EBV также ассоциируется при патогенезе двух опухолей: лимфомой Буркитта и раком носоглотки. Описание исследований DNA гибридизации указывают на присутствие EBV генома в образцах биопсии, взятых у пациентов с этими видами опухоли.

Лимфома Буркитта первично обнаружена в Африке, особенно у детей и в Новой Гвинее. Часто ставится диагноз инфекции малярии при лимфоме Буркитта и предположено является со-фактором. Рак носоглотки наблюдается в Азии, особенно в Южном Китае, и связано с генетическим или влиянием окружающей среды в качестве со-фактора.

За последние два десятилетия серологические методы улучшались от тестирования на присутствие неспецифических гетерофильных антител до измерения уровня IgG и IgG, что

формируются против субъединиц EBV антиген комплексов. Одним из наилучших индикаторов активности EBV инфекции является антитело к вирусному капсульному антигену, структурный протенин необходимый для репродукции вируса. Вирусный капсульный антиген присутствует в каждой инфицированной EBV клетке. IgG, что относится к VCA является одним из наиболее раннего определяемого иммунного ответа, что обычно присутствует при начале заболевания, и достигающего своего пика на 4-6 неделю. Уровни IgG являются также временными, быстро уменьшающиеся до неопределяемого уровня в течении 2-3 месяцев после начала клинических симптомов.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Очищенный антиген EBV-VCA привитый к поверхности микролунок. Разбавленная сыворотка пациента добавляется в лунки специфическое IgG антитело, если присутствует, связывается с антигеном. Все несвязанные материалы вымываются. После добавления ферментного конъюгата, он связывается с антитело-антиген комплексом. Излишки конъюгата вымываются и добавляется субстрат. Каталитическая реакция ферментного конъюгата останавливается в определенное время. Интенсивность цвета пропорциональна количеству специфического IgG антитела в образце. Результаты считываются микропланшетным ридером и сравниваются с калибратором и контролями.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Стрипы микропланшета: лунки с привитым антигеном EBV-VCA – 12x8 лунок.
2. Разбавитель образца: раствор синего цвета, 1 фл/22 мл.
3. Промывочный концентрат: 10x концентрат, белый колпачок – 1 бут. /100 мл.
4. Хромогенный раствор ТМВ: янтарная бутылка – 1 фл/15 мл.
5. Ферментный конъюгат: раствор красного цвета – 1 фл/12 мл.
6. Отрицательный контроль: диапазон указан на этикетке, прозрачный колпачок – 1 фл/150 мкл.
7. Калибратор: значение коэфф. (f) указано на этикетке, прозрачный колпачок – 1 фл/ 150 мкл.
8. Положительный контроль: диапазон указан на этикетке, красный колпачок – 1 фл/150 мкл.
9. Стоп-раствор – 1фл/12 мл.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8°C.
2. Храните микролунки запечатанными в сухом пакете с осушителем. Мы рекомендуем использовать все лунки в течении 4 недель после первого вскрытия.
3. Реагенты стабильны до окончания срока пригодности.
4. Храните реагенты от тепла, солнца и сильного света.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Обращайтесь с реагентами как с потенциально инфекционными.
2. Не пипетируйте ртом. Не ешьте, не пейте и не курите в местах использования реагентов.
3. Компоненты набора предназначены для использования как единое целое. Не смешивайте компоненты разных лотов.
4. Этот продукт содержит компоненты с азидом натрия. Азид натрия может реагировать с свинцом и медью и формировать взрывоопасное вещество. При попадании промойте большим количеством воды.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови и отделите сыворотку.
2. Образцы хранятся при 2-8°C до семи дней и замороженными до шести месяцев. Избегайте повторных циклов замораживания/ размораживания.
3. Если парная сыворотка была собрана, образцы при острой фазе следует собрать как можно быстрее после установившихся симптомов, но не позднее семи дней после установившихся симптомов. Второй образец следует собрать после 14-21 дней после сбора образца. Два образца следует анализировать в дубликаты на том самом планшете для анализа разницы. Если первый образец был получен слишком поздно во время инфекции, значительная разница может быть не определена.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ К АНАЛИЗУ

1. Приготовьте 1x промывочный буфер. Приготовьте промывочный буфер добавлением дистиллированной или деионизированной воды в 10x промывочный концентрат до конечного объема 1 л.
2. Приведите все образцы и реагенты к комнатной температуре (20-25°C) и хорошо смешайте.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместите необходимое количество стрипов в держатель.
2. Приготовьте 1:21 разбавление добавлением 10 мкл образцов, отрицательного контроля, положительного контроля и калибратора к 200 мкл абсорбирующего раствора. Тщательно перемешайте.
3. Внесите 100 мкл разбавленных сывороток, калибратора и контролей в соответствующие лунки. Для реагента бланка, внесите 100 мкл абсорбирующего раствора в лунку A1. Встряхните держатель для удаления пузырей и перемешайте. Инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре.
4. Удалите жидкость с лунок. Повторите промывание промывочным буфером три раза.
5. Внесите 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку и инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре.
6. Удалите ферментный конъюгат с лунок. Повторите промывание промывочным буфером три раза.
7. Внесите 100 мкл ТМБ субстрат и инкубируйте 30 мин. при комнатной температуре.
8. Добавьте 100 мкл стоп раствора для остановки реакции. Перед считыванием убедитесь, что в лунках нет воздушных пузырей.
9. Считайте ОП микролуночным ридером при 450 нм.

ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Для получения порогового значения ОП: Умножить ОП калибратора на коэфф., напечатанный на этикетке калибратора.
2. Вычислите коэффициент EBV-VCA IgG каждого определения делением значения ОП каждого образца на полученную ОП порогового значения.

Пример:

Если значение коэфф. (f) на этикетке = 0,4
 Полученная ОП калибратора = 1,100
 ОП порогового значения = 1,100 x 0,4 = 0,44 (по определению коэфф. EBV-VCA IgG = 1)

ОП образца пациента = 0,580
 Коэфф. EBV-VCA IgG = 0,580/0,44 = 1,32 (положительный результат)

ОП образца пациента = 0,320
 Коэфф. EBV-VCA IgG = 0,320/0,44 = 0,73 (отрицательный результат)

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Анализ будет действительный при выполнении следующих условиях:

1. Значение ОП реагента бланка вхолостую должно быть меньше, чем 0,150.
2. Если значение ОП калибратора ниже чем 0,250, анализ недействительный и его необходимо повторить.
3. Коэффициент EBV-VCA IgM для отрицательного и положительного контроля должен быть в диапазоне, указанном на этикетке.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Отрицательный: Коэффициент EBV-VCA равен 0,90 или меньше является серонегативным к IgG антителам.

Сомнительный: Коэффициент EBV-VCA равен 0,91-0,99 является сомнительным. Образцы следует тестировать повторно.

Положительный: Коэффициент EBV-VCA равен 1,00 или выше является сероположительным. Указывает на недавнюю или острую инфекцию.

Значительная разница уровня антитела парных образцов: Коэффициент между EBV-VCA IgG коэффициентом второго образца и первого должен быть выше 1,3 для предположения значительной разницы между уровнем антитела.

ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

1. Один образец сыворотки не может использоваться для определения недавней инфекции.
2. Образец сыворотки, собранный слишком рано во время острой фазы может содержать низкий уровень IgG антитела и дать отрицательный результат.
3. Как и при других диагностических процедурах, результаты этого анализа должны использоваться вместе с доступными клиническими данными и результатами другой диагностической процедурой.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**Чувствительность, специфичность и точность**

Чувствительность, специфичность и точность были определены с помощью коммерческого ELISA набора на 225 образцах. Результаты показаны ниже:

		Референтный ИФА			
		О	С	П	Всего
ИФА DAI	О	11 (D)	0	0 (B)	11
	С	0	3	0	3
	П	0 (C)	0	211 (A)	211
	Всего	11	3	211	225

Чувствительность = $A / (A+B) = 211/211 = 100\%$

Специфичность = $D/(D+C) = 11/11 = 100\%$

Точность = $(A+D) / (A+B+C+D) = 222/222 = 100\%$

Точность

Были вычислены среднее, СО и % КВ для определения точности внутри и между анализами.

Точность в анализе				
	n	Коэффициент G средний	СО	%КВ
Сыворотка 1	8	0,1705	0,0074	4,39
Сыворотка 2	8	1,274	0,0997	7,83
Сыворотка 3	8	2,330	0,1640	7,04
Сыворотка 4	8	2,481	0,1099	4,43
Точность между анализами				
Сыворотка 1	8	0,170	0,0071	4,20
Сыворотка 2	8	1,296	0,0486	3,75
Сыворотка 3	8	2,278	0,1220	5,36
Сыворотка 4	8	2,444	0,2543	10,41

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Титр антител одного образца не может использоваться для определения недавней инфекции. Результаты теста должны интерпретироваться вместе с другими клиническими заключениями и результатами тестов антитела к другим EBV антигенам.
2. Большинство (80%) ИМ индивидов имеют пик анти-VCA титров до их консультации у врача. Поэтому, парное тестирование сыворотки при острой фазе и выздоравливающей на разницу между уровнями антитела не является полезным для большинства пациентов с ИМ.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua