

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ КЛАСУ IgM ДО КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА ВІРУСУ ЕПШТЕЙНА-БАРР

1406-2Z, EBV VCA IgM

Каталог. №: 1406-2Z
Виробник : DAI (США)

Методика від 23-01-2013



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу інструкції та перекладу повинні співпадати.

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Кількість тестів	96 тестів
Тест	EBV VCA IgM ELISA
Метод	Імуносорбентний аналіз з застосуванням фіксованих ферментів
Принцип	Непрямий ІФА: покритий антигеном планшет
Діапазон виявлення	Якісний: Позитивний та Негативний контроль і Порогове значення (cut-off)
Взорець	10 мкл сироватки
Специфічність	93.2 %
Чутливість	90.9 %
Загальний час	~ 90 хвилин
Зберігання	12-18 місяців

* Лабораторні аналізи не можуть бути єдиними критеріями для медичного висновку. Історія хвороби пацієнта і наступні тести повинні бути прийняті до уваги.

ПРИНЦИП

Дана система аналізу розроблена для визначення антитіл класу IgM до капсульного антигену вірусу Епштейна-Барр в зразках людської сироватки. Лунки в пластмасових мікролуночних смужках сенсibiliзуються пасивною абсорбцією з антигеном вірусу Епштейна-Барр. Процедура аналізу включає три інкубаційних етапи:

1. Сироватки, що аналізуються, розбавляються Розріджувачем зразка. Розріджувач зразка містить анти-людське антитіло класу IgM, яке осаджує і видалає IgM і ревматоїдний фактор із зразка, залишаючи IgM для вільної взаємодії із зафіксованим антигеном.
2. В лунки додається пероксидаза, кон'югована козячим анти-людським IgM (специфічний μ -ланцюжок), і планшет інкубується. Кон'югат вступає в реакцію з IgM антитілом, зафіксованим у твердій фазі на етапі 1. Для видалення кон'югату, який не вступив в реакцію, промиваються лунки.
3. Лунки на мікротитраційному планшеті, які містять зафіксований кон'югат пероксидази, інкубуються з розчином субстрату пероксидази. Гідроліз субстрату пероксидазою призводить до зміни кольору. Після деякого часу реакція зупиняється і інтенсивність кольору розчину вимірюється фотометричним методом. Інтенсивність кольору розчину залежить від концентрації антитіл в аналізованому первинному зразку.

ЗАБІР ЗРАЗКІВ

Рекомендується проводити забір зразків відповідно до документу NCCLS M29: Захист співробітників лабораторій від інфекційних хвороб.

Жоден з відомих методів не може забезпечити повну впевненість в тому, що зразки людської крові не здатні передавати інфекцію. Тому, всі похідні крові повинні вважатися потенційно інфекційними.

У цьому аналізі повинні використовуватися тільки нещодавно зібрані і належним чином збережені сироватки крові, отримані схваленими асептичними процедурами венопункції. Ніякі антикоагулянти або консерванти не повинні додаватися. Уникайте використання гемолізованих, ліпемічних або бактеріологічно забруднених сироваток.

Зберігайте зразок при кімнатній температурі не більше 8 годин. Якщо аналіз не виконується в межах 8 годин, сироватки можуть зберігатися при 2-8 °C не більше 48 годин. Якщо очікується затримка в аналізі, зберігайте сироватку для аналізу при -20 °C або нижче. Уникайте циклів багаторазового заморожування/розморожування, які можуть викликати втрату активності антитіл і давати помилкові результати.

МАТЕРІАЛИ І ОБЛАДНАННЯ

Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

- Мікропланшетний зчитувач з довжиною хвилі вимірювання 450 нм.
- Мікропіпетки для точного дозування від 10 до 200 мкл.
- Багатоканальна піпетка для точного дозування (50-200 мкл).
- Резервуари реагентів для багатоканальних піпеток.
- Промивна пляшка чи система промивання планшета.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Мірний циліндр на 1 л.
- Серологічні піпетки.
- Одноразові наконечники для піпеток.
- Паперові рушники.
- Лабораторний таймер для дотримання етапів інкубації.
- Контейнер для відходів і дезінфікуючий засіб (Наприклад: 10% господарський відбілювач, 0,5% гіпохлорит натрію).

МАТЕРІАЛИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Планшет. 96 лунок, розташованих в дванадцяти 1 x 8- лункових смужках, покритих очищеною системою «антиген-антитіло» капсидним пептидом 125 кД, отриманим від клітин P3-HR1. Смужки в рамці упаковані в пакеті з осушувачем.
2. Кон'югат. Пероксидаза хрому, кон'югована козячим анти-людським IgM антитілом (специфічний μ -ланцюжок). Готовий до використання. Один 15 мл флакон з білою кришкою.
3. Позитивний контроль (людська сироватка). Один 0,35 мл флакон з червоною кришкою.
4. Калібратор (людська сироватка). Один 0,5 мл флакон з синьою кришкою.
5. Негативний контроль (людська сироватка). Один 0,35 мл флакон із зеленою кришкою.
6. Розріджувач зразка. Одна 30 мл пляшка (синя кришка), що містить Твін-20, бичачий сироватковий альбумін, фосфатний буферизований сольовий розчин і козячий анти-людський IgG (специфічний γ -ланцюжок) (pH 7,2 \pm 0,2). Фіолетовий розчин, готовий до використання. Примітка: перед використанням добре збовтати.
7. ТМБ: Одна 15 мл бурштинова пляшка, що містить 3,3 ' , 5,5 ' - тетраметилбензидин (ТМБ). Готовий до використання. Містить DMSO < 15% (w).
8. Стоп розчин: Одна 15 мл пляшка (червона кришка), що містить 1M H₂SO₄, 0.7 M HCl. Готовий до використання.
9. Концентрат промивного буфера (10X): розбавити 1 частину концентрату + 9 частин деіонізованої або дистильованої води. Одна 100 мл пляшка (прозора кришка) містить 10X концентрований фосфат - буферизований сольовий розчин і Твін-20 (синій розчин). ПРИМІТКА: 1X розчин має pH 7.2 \pm 0,2.

Наступні компоненти не залежать від номера партії набору і можуть взаємо замінюватись в ІФА: ТМБ, стоп розчин і промивний буфер.

Примітка: Набір також містить:

1. Перелік компонентів з детальною інформацією про їх партії всередині упаковки набору.
2. Вкладиш з інструкціями з використання.

Вимоги до зберігання:

1. Зберігати нерозкритий набір при 2-8 °C.
2. Мікролуночні смужки: зберігати при 2-8 °C. Зайві смужки повинні бути негайно повторно запечатані з осушувачем і повернуті для відповідного зберігання. Смужки стабільні протягом 60 днів після того, як мішечок був відкритий і належним чином запечатаний, і індикатор залишається синім.
3. Кон'югат: Зберігати при 2-8 °C. Забороняється заморожувати.
4. Калібратор, позитивний і негативний контроль: Зберігати при 2-8 °C.
5. ТМБ: Зберігати при 2-8 °C.
6. Концентрат промивного буфера (10X). Зберігати при 2-25 °C. Розведений промивний буфер (1x) стабільний протягом 7 днів, якщо зберігати при кімнатній температурі, або 30 днів при 2-8 °C.
7. Розріджувач зразка: Зберігати при 2-8 °C.
8. Стоп розчин: Зберігати при 2-25 °C.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

1. Під час кожної процедури аналізу калібратор повинен аналізуватися в трьох примірниках. Бланк реагент, негативний і позитивний контроль повинні також бути включені в кожному аналізі.
2. Обчисліть середнє значення трьох лунок калібраторів. Якщо будь-яке з трьох значень відрізняється більше ніж на 15 % від середнього, відкиньте це значення, і обчисліть середнє інших двох значень.

3. Середнє значення ОЩ калібратора і значень ОЩ позитивного і негативного контролей повинно знаходитися в межах наступного діапазону :

	Діапазон ОЩ
Негативний контроль	≤ 0.250
Калібратор	> 0.300
Позитивний контроль	≥ 0.500

- ОЩ негативного контролю, розділена на середню ОЩ низько позитивного стандарту, повинна становити ≤ 0.9.
 - ОЩ позитивного контролю, розділена на середню ОЩ низько позитивного стандарту, повинна становити ≥ 1.25.
 - Якщо значення контролів не перебувають в межах вищезазначених діапазонів, аналіз слід вважати недійсним, і його необхідно повторити.
4. Позитивний і негативний контролі призначені для контролю істотної невідповідності реагенту і не гарантує точності в пороговому діапазоні аналізу.
5. Відповідно до рекомендацій або вимог місцевих, державних та/або федеральних правил або акредитованих організацій, можуть аналізуватися додаткові контролі.
6. За рекомендаціями належної практики контролю якості дивіться на документ C24 NCCLS: Статистичний контроль якості при кількісних вимірах.

ПРОЦЕДУРА - ПОСЛІДОВНІСТЬ

- Дістаньте окремі компоненти набору з місця зберігання і дозвольте їм нагрітися до кімнатної температури (20-25 °С).
- Визначте необхідну кількість мікролунок. Проведіть шість визначень контролів/калібраторів (одного бланка, одного негативного контролю, трьох калібраторів і одного позитивного контролю) в одній процедурі. Бланк реагент повинен застосовуватись в кожному аналізі. Перевірте вимоги до програмного забезпечення та зчитувального пристрою для правильних конфігурацій контролів/калібраторів. Поверніть невикористані смужки в з мішечок з осушувачем, герметично закрийте і верніть на зберігання при 2-8 °С.

ПРИКЛАД СХЕМИ ПЛАНШЕТА		
	1	2
A	Бланк	Пацієнт 3
B	Негативний контроль	Пацієнт 4
C	Калібратор	і т. д.
D	Калібратор	
E	Калібратор	
F	Позитивний контроль	
G	Пацієнт 1	
H	Пацієнт 2	

- Проведіть розбавлення 1:21 (наприклад: 10 мкл сироватки + 200 мкл розчинника зразка. ПРИМІТКА: перед використанням добре збовтати) негативного контролю, калібратора, позитивного контролю та кожної сироватки пацієнта.
- В окремі лунки додайте 100 мкл кожного розведеного контролю, калібратора і зразка з планшета абсорбенту в планшет для аналізу. Переконайтеся, що зразки належним чином перемішані. Для кожного зразка використовуйте різні наконечники піпеток.
- В лунку A1 в якості бланк реагенту внесіть 100 мкл розчинника зразка. Перевірте вимоги до програмного забезпечення та зчитувального пристрою для правильних конфігурацій лунки бланка реагенту.
- Інкубуйте планшет при кімнатній температурі (20-25 °С) протягом 25 ± 5 хвилин.
- Промийте мікролунокві смужки 5X .

A. Ручна процедура промивки:

- Різно витрусіть рідину з лунок.
- Заповніть кожну лунку промивним буфером. Впевніться у відсутності в лунках повітряних бульбашок.
- Повторіть етапи a. і b., щоб у загальній кількості провести 5 промивань.
- Витрусіть промивний розчин з усіх лунок. Переверніть планшет на паперовий рушник і сильно постукайте, щоб видалити з лунок будь-який залишок розчину для промивання. Огляньте планшет, переконавшись у відсутності залишку розчину для промивання. В кінці кожного робочого дня збирайте промивний розчин в емність для відходів, і обробляйте гіпохлоритом натрію 0.5 % (відбілювачем) .

B. Автоматизована процедура промивки:

При використанні автоматизованої промивної установки, відрегулюйте об'єм розподілу на 300-350 мкл/лунку. Налаштуйте цикл промивки на 5 промивок без затримки між промивками. Вийміть мікротитрувальний планшет з промивача, переверніть планшет на паперовий рушник і сильно постукайте, щоб видалити з лунок будь-який залишок розчину для промивання.

- Додайте 100 мкл кон'югату в кожну лунку, включаючи лунку бланка, в тому ж темпі і порядку як додавалися зразки.
- Інкубуйте планшет при кімнатній температурі (20-25 °С) протягом 25 ± 5 хвилин.
- Промийте мікролунок, дотримуючись процедури в етапі 8.
- Додайте 100 мкл розчину субстрату ТМБ в кожну лунку в тому ж темпі і порядку як додавалися зразки .
- Інкубуйте планшет при кімнатній температурі (20-25 °С) протягом 10-15 хвилин.
- Зупиніть реакцію додаванням 50 мкл стоп розчину в кожну лунку, включаючи лунку бланка, в тому ж темпі і порядку як додавався ТМБ. Позитивні зразки з синього кольору стануть жовтими. Після додавання стоп розчину постукайте по планшету кілька разів, переконавшись, що зразки повністю змішані.
- Налаштуйте зчитувальний пристрій для зчитування при довжині хвилі 450 нм і виміряйте оптичну щільність (ОЩ) кожної лунки проти бланка реагенту. Планшет необхідно зчитувати в межах 30 хвилин після додавання стоп розчину.

РОЗРАХУНОК/ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

A. Обчислення:

1. Коефіцієнт корекції

Значення межі виявлення ОЩ для позитивних зразків було визначено виробником і скориговано стосовно калібратора. Коефіцієнт корекції (КК) дає можливість визначити значення межі виявлення для позитивних зразків і виправити незначні щоденні відхилення в результатах аналізу. КК визначається для кожної партії компонентів набору в переліку компонентів в упаковці набору.

2. Значення межі виявлення ОЩ

Для отримання значення межі виявлення ОЩ помножте КК на середнє значення калібратора, визначене вище.

(КК x середня ОЩ калібратора = значення межі виявлення ОЩ).

3. Значення коефіцієнта або коефіцієнти ОЩ

Обчисліть значення коефіцієнта або коефіцієнт ОЩ для кожного зразка шляхом поділу значення його ОЩ на межу виявлення ОЩ з етапу 2.

Приклад:

Середнє значення ОЩ калібратора = 0,793
 Коефіцієнт корекції (КК) = 0,25
 Межа виявлення ОЩ = 0,793 x 0,25 = 0,198
 ОЩ невідомого зразка = 0,432
 Коефіцієнт значення зразка або коефіцієнт ОЩ = 0.432/0,198 = 2,18

B. інтерпретації :

Значення коефіцієнта або коефіцієнти ОЩ інтерпретуються наступним чином:

Значення коефіцієнта або коефіцієнт ОЩ:

Негативні зразки ≤ 0,90
 Сумнівні зразки 0,91 до 1,09
 Позитивні зразки ≥ 1,10

- Коефіцієнт ОЩ ≤ 0,90 вказує на відсутність антитіл класу IgM до капсульного антигену вірусу Епштейна-Барр, які виявляються. Негативний результат свідчить про відсутність поточної інфекції, і повинен інтерпретуватися як нереактивний щодо IgM антитіл до капсульного антигену вірусу Епштейна-Барр. Такі особи вважаються схильними до первинної інфекції.
- Коефіцієнт ОП ≥ 1,10 є позитивним щодо IgM антитіл до капсульного антигену вірусу Епштейна-Барр. Позитивний результат дослідження вказує на поточне або відновлене інфікування, і повинен інтерпретуватися як реактивний щодо IgM антитіл до капсульного антигену вірусу Епштейна-Барр.
- Зразки зі значеннями коефіцієнта ОЩ в сумнівному діапазоні (0,91-1,09) повинні бути повторно перевірені альтернативною серологічною методикою, типу непрямого флуоресцентного антитіла (НФА) «Зюс Сайентифик, Інк.». Крім того, зразки, які залишаються сумнівними після повторного дослідження, повинні бути переглянуті в процесі дослідження іншого зразка двома тижнями пізніше.
- Числове значення кінцевого результату вище порогового значення не визначає наявність в даний час IgM антитіл до капсульного антигену вірусу Епштейна-Барр.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Для діагностичного використання in-vitro.
- При поводженні з лабораторними реагентами необхідно дотримуватися стандартних заходів обережності. У разі контакту з очима, промийте негайно великою кількістю води та

зверніться за медичною допомогою. Носіть відповідний захисний одяг, рукавички і захисний засіб для очей/ обличчя. Не вдихайте пару. Знищуйте відходи, дотримуючись всіх місцевих і державних законів.

3. Лунки планшета ІФА не містять життєздатних організмів. Однак, смужки повинні розглядатися як **ПОТЕНЦІЙНІ БІОНЕБЕЗПЕЧНІ МАТЕРІАЛИ** і вимагають відповідного поводження з ними.
4. Контролі людської сироватки - **ПОТЕНЦІЙНІ БІОНЕБЕЗПЕЧНІ МАТЕРІАЛИ**. Вихідні матеріали, з яких ці продукти були отримані, були підтверджені схваленим методом аналізу. Оскільки ніякий метод аналізу не може повністю гарантувати відсутність збудників інфекцій, ці продукти вимагають поводження з дотриманням 2 рівня біологічної безпеки, як рекомендується при поводженні з будь-якою потенційно інфекційною людською сироваткою або зразком крові.
5. Розріджувач зразка, контролю, промивний буфер, абсорбент і кон'югат містять азид натрію в концентрації 0,1 % (в/о). Азид натрію вважається таким, який утворює азиди свинцю і міді у внутрішній каналізації лабораторії. Що може викликати вибух при ударі. Щоб уникнути цього, ретельно промийте раковину водою після утилізації розчину з азидом натрію.
6. Чітке дотримання певного часу і температури інкубації є важливим для отримання точних результатів. Всі реагенти перед початком аналізу повинні бути приведені до кімнатної температури (20-25 °C). Безпосередньо після використання невикористані реагенти поверніть в температуру охолодження.
7. Неправильне промивання призводить до помилково позитивних або помилково негативних результатів. Переконайтеся, що в планшетах не залишилося будь-якого залишку розчину для промивання перед додаванням кон'югату або розчину субстрату. Не дозволяйте лункам висихати між інкубаціями.
8. Стоп розчин є **ТОКСИЧНИМ**. Призводить до опіків. Є токсичним при вдиханні, при контакті зі шкірою і при ковтанні. При нещасному випадку або при поганому самопочутті негайно зверніться за медичною допомогою.
9. ТМБ розчин є **НЕБЕЗПЕЧНИМ**. Подразнює очі, дихальну систему та шкіру.
10. 1Концентрат промивного буфера є **ПОДРАЗНИКОМ**. Дратівливий для очей, дихальної системи та шкіри.
11. Не залишайте на дні планшета залишків рідини та/або слідів пальців, які можуть змінювати результати зчитувань оптичної щільності (ОЩ).
12. Розбавлення або змішування цих реагентів може дати помилкові результати.
13. Реагенти з інших джерел або виробників не повинні використовуватися.
14. ТМБ розчин повинен бути безбарвним, світло-жовтим, світло-зеленим або світло-синім під час використання. Забруднення ТМБ з кон'югатом або іншими окислювачами передчасно викликає зміну кольору. Не використовуйте ТМБ, якщо він виразного синього кольору.
15. Ніколи не піпетуйте ротом. Уникайте контакту реагентів та зразків пацієнтів зі шкірою або слизовими оболонками.
16. Уникайте мікробіологічного забруднення реагентів. Можуть бути отримані неправильні результати.
17. Перехресне забруднення реагентів і/або зразків може викликати помилкові результати.
18. Багаторазовий скляний посуд повинен бути вимитий і повністю виполосканий, щоб очиститися від усіх детергентів.
19. Уникайте розбризкування або утворення аерозолів.
20. Не піддавайте реагенти дії прямих сонячних променів протягом зберігання або інкубації.
21. Приводячи мікролункові смужки і тримач до кімнатної температури перед розкриттям, захистіть захисний мішечок і лунки від конденсації.
22. Розчин для промивання необхідно зібрати в ємність для відходів. Обробіть розчин для відходів з 10% господарським відбілювачем (0,5 % гіпохлорит натрію). Уникайте впливу випаровувань відбілювача на реагенти.
23. Застереження: Рідкі відходи в кислоті рН повинні бути нейтралізовані перед додаванням до вибілюючої речовини.
24. Не використовувати планшет ІФА, якщо смужка індикатора на мішечку з висушувачем змінила колір з синього на рожевий.
25. Не дозволяйте кон'югату вступати в контакт з ємностями, які, можливо, містили розчини, що мають у своєму складі азид натрію як консервант. Залишкові кількості азиду натрію можуть знищити ферментну активність кон'югату.
26. Не піддавайте ніякий з реагентів впливу розчинів, що містять відбілюючу речовину. Залишкова кількість відбілюючої речовини (гіпохлорит натрію) може знищити біологічну активність багатьох реагентів з цього набору.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

1. Більшість (80 %) осіб з ІМ мають пік титрів анти-ВЕБ IgM, перш ніж вони проконсультувалися з лікарем (4). Таким чином,

дослідження парних сироваток з гострою та одужуючою симптоматикою не є корисним для більшості пацієнтів з ІМ з метою визначення значної зміни у рівні антитіл (4).

2. Титр антитіл в сироватці крові одного зразка не повинен використовуватися для визначення недавньої інфекції. Результати дослідження анти-ВЕБ слід тлумачити у поєднанні з клінічною оцінкою і результатами дослідження антитіл до інших антигенів ВЕБ, тобто PA , IgG-ВЕБ.
3. Відсутність IgM антитіл не виключає поточної інфекції ВЕБ. Зразки могли бути зібрані до явного розвитку антитіл , або після того, як рівень антитіл більше не підлягав виявленню.
4. Результати випробувань зразків імунодепресивних пацієнтів можуть бути важкими для тлумачення.
5. Специфічні антитіла IgM, як правило, виявляються у пацієнтів з недавною первинною інфекцією, але можуть бути виявлені у пацієнтів з відновленою або вторинною інфекцією, і вони іноді зустрічаються у пацієнтів, у яких відсутні явні ознаки недавньої інфекції.
6. Було зафіксовано, що абсорбент анти-IgG функціонально видаляє $\geq 13,9$ мг/мл IgG із сироватки крові людини. Нормальні рівні IgG дорослих можуть варіюватися від 8 до 16 мг/мл (32). Пацієнтам з рівнем IgG більше 14 мг/мл може знадобитися додаткове лікування, щоб нейтралізувати всі IgG.
7. Робочі характеристики цього набору не були встановлені з супутнім захворюванням ЕБВ, крім інфекційного мононуклеозу .
8. Для установки діагнозу результати випробувань повинні бути оцінені по відношенню до симптомів хворого, анамнезу, а також до інших лабораторних даних.



ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ ЗАМОВЛЕННЯ

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
diameb.com