

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgM ДО РАНЬОГО АНТИГЕНУ ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСУ

Ea IgM

Кат. №: **EAM.CE**

Дата випуску інструкції: **01-2020**
Версія: **3**



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

Імуноферментний аналіз (ІФА) для якісного визначення антитіл IgM до раннього антигену Епштейна-Барр вірусу у сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз для якісного визначення антитіл IgM до раннього антигену вірусу Епштейна-Барр в сироватці та плазмі людини. Тільки для діагностики *in vitro*.

В. ВСТУП

Вірус Епштейна-Барр або EBV є основним етіологічним агентом інфекційного мононуклеозу, а також фактором, що сприяє етіології лімфоми Беркітта та карциноми носоглотки, або NPC.

Представник родини *Herpesviridae*, він поширений у всьому світі, так що від 80 до 90% всіх дорослих людей інфіковані. Первинні інфекції зазвичай виникають протягом першого десятиліття життя. У той час як дитячі інфекції переважно протікають безсимптомно, 50-70% молодих людей, які перенесли первинну інфекцію EBV, мають легке або важке захворювання.

EBV може викликати стійку, приховану інфекцію, яка може бути реактивована при імуносупресії або у хворих на СНІД. Оскільки гуморальна реакція на первинну інфекцію EBV є досить швидкою, рівень і клас антитіл, що підвищуються в більшості випадків, дозволяють класифікувати, чи пацієнт все ще сприйнятливий, чи має поточну або нещодавню первинну інфекцію, переніс інфекцію в минулому чи може мати повторно активовану EBV інфекцію.

Таким чином, виявлення специфічних до EBV IgG, IgM та IgA антитіл до його основних імунодомінантних антигенів (ядерний антиген, вірусний капсидний антиген, ранній антиген) стало важливим і корисним визначенням для моніторингу та спостереження за пацієнтами, інфікованими EBV.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті афінно очищеним нативним EBV EA. Під час 1-ї інкубації тверду фазу обробляють розведеними зразками, і анти-EA IgM захоплюються антигенами, якщо вони присутні.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка, у 2-й інкубації зв'язані анти-EA IgM виявляються шляхом додавання антитіла до hIgM, міченого пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, який пропорційний кількості IgM антитіл анти-EA, присутніх у зразку.

Інтерференції, викликані IgG та RF у зразках, блокуються безпосередньо в лунці за допомогою Нейтралізуючого Реагенту.

Д. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатню кількість реагентів для виконання 96 тестів.

1. Мікропланшет: MICROPLATE

12 смужок x 8 мікролунок, покритих афінно очищеним нативним EA. Пластини запечатані в пакет з осушувачем. Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітись до кімнатної температури; повторно запечатайте невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігайте при 4 °C (°C).

2. Негативний контроль: CONTROL -

1x4 мл (ml). На основі сироватки людини, не реактивної на антитіла анти-EA IgM. Містить 0.2 мг/мл (mg/ml) гентаміцину сульфату та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Негативний контроль має білдожовтий колір.

3. Позитивний контроль: CONTROL +

1x4 мл (ml). На основі сироватки людини, не реактивної на антитіла анти-EA IgM. Містить 0.2 мг/мл (mg/ml) гентаміцину сульфату та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Позитивний контроль має зелений колір.

4. Концентрат промивного буфера: WASHBUF 20X

1x60 мл/пляшка (ml/bottle) 20X концентрований розчин. Після розведення промивний розчин містить 10 mM (mM) фосфатний буфер, pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% Tween 20 та 0.045% ProClin 300.

5. Ферментний кон'югат: CONJ

1x16 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання, кодований червоним кольором. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому поліклональні антитіла до IgM людини, 5% BSA, 10 mM (mM) Трис-буфер pH 6.8 +/- 0.1, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцин сульфат як консерванти.

6. Розчинник для зразків: DILSPE

2x60 мл/флакон (ml/vial). Буферизований розчин для розведення зразків. Містить 2% казеїну, 0.2 M Tris-буфер pH 6.0 +/- 0.1, 0.2% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Компонент кодується блакитним кольором.

7. Нейтралізуючий реагент: SOLN NEUT

1x8 мл (ml). Протеїновий розчин для нейтралізації IgG та РФ у зразках. Містить детергент, протеїнові стабілізатори, 0.1% азиду натрію і 0.045% ProClin 300 як консерванти.

8. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл/флакон (ml/vial). Він містить 50 mM (mM) цитратно-фосфатний буфер, pH 3.5-3.8, 0.03% тетра-метил-бензидину (або TMB) та 0.02% перекису водню (H₂O₂).

Примітка: Зберігати захищеним від світла через чутливість до сильного освітлення.

9. Сірчана кислота: H₂SO₄ 0.3 M (M)

1x15 мл/флакон (ml/vial). Містить розчин 0.3 M (M) H₂SO₄. Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

10. Уцільнювальна фольга для планшета x 2 шт.

11. Вкладиш інструкції x 1 шт.

Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Калібровані мікропіпетки в діапазоні 10-1000 мкл (µl) та одноразові пластикові наконечники.
- Вода класу EIA (бідистильована або деіонізована, деревне вугілля, оброблене для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
- Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
- Абсорбуючі паперові серветки.
- Відкалібрований термостатичний інкубатор для мікропланшетів ІФА (сухий або вологий), встановлений на +37 °C (°C).
- Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 nm (nm) (зчитування) та з 620-630 nm (nm) (бланкування).
- Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
- Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
- Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в

- публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедицині лабораторіях», вид. 1984 рік.
3. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
 4. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Не надавайте Хромоген (ТМВ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стелю, де проводиться випробування.
 5. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
 6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
 7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
 8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
 9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
 10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведені на відкритому наборі, не вказало на будь-яку відповідну втрату активності до 6 повторних використання пристрою протягом 3 місяців.
 11. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитися на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедицині лабораторіях», вид. 1984 рік.
 12. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
 13. Відходи, що утворилися під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв.
 14. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
 15. Сірчана кислота є подразнюючою. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
 16. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

G. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків; особливо азид натрію, оскільки ця хімічна речовина вплине на ферментативну активність кон'югату.
3. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування, коли набір використовується для скринінгу одиниць крові.

4. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важкі частинки або мікробні нитки та тіла, слід викинути, оскільки вони можуть привести до помилкових результатів.
5. Сироватку та плазму можна зберігати при + 2-8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморозуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно виїняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморозувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
6. Якщо є частинки, центрифугувати при 2000 об/хв (rpm) протягом 20 хвилин або фільтрувати за допомогою фільтрів 0.2-0.8 мкм (µ), щоб очистити зразок для тестування.

H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Дослідження, проведені на відкритому наборі, не вказало на істотну втрату активності до 6 повторних використання пристрою та до 3 місяців.

Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету досягти кімнатної температури (близько 1 години). Переконайтеся, що осушувач не набув темно-зеленого забарвлення, що вказує на дефект виробництва.

У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів Dia.Pro. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий пакет, разом з осушувачем, щільно закрити і зберігати при + 2-8 °C (°C).

Важливе зауваження: При першому відкритті смужки, що залишились, є стабільними, поки показник вологості всередині мішка з осушувачем не змінює колір з жовтого на зелений.

Контролі:

Готові до використання. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням увесь вміст концентрованого розчину слід розбавити 20X бідистильованою водою до 1200 мл (ml) і обережно перемішати обертанням з денця на кришку. Під час приготування уникайте піноутворення, оскільки наявність бульбашок може спричинити погану ефективність промивання.

Примітка: Після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при + 2..8 °C (°C).

Розчинник зразка:

Готовий до використання. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

Нейтралізуючий реагент:

Готовий до використання. Перед використанням перемішайте на вортексі.

Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами. Не надавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову, доступну стерильну одноразову тару.

Сірчана кислота:

Готова до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Увага: Подразнююча речовина (H315, H319, P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Легенда:

Попереджувальні H-фрази:

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні P-фрази:

P280 - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

P302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКИРУ: Змити великою кількістю мила та води.

P332+P313 - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P305+P351+P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В Очі: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

P337+P313 - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P362+P363 - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

I. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (70% етанол, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та достовірність +/- 2%.
2. Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубацій підходять як сухі інкубатори, так і водяні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА і забезпечується правильна температура +37 °C (°C) для мікропланшета.
3. **Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очищати від солей деіонізованою водою. Перед використанням вошер слід інтенсивно праймувати розведеним Промивним Розчином. Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 М (М) NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку (μ/well) промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками. Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилково позитивних реакцій.
4. Час інкубації має допуск +/- 5%.
5. Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (a) пропускна здатність ≤ 10 нм (nm); (b) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (c) лінійність до ≥ 2.0; (d) повторюваність ≥ 1%. Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.
6. При використанні автоматизованої робочої станції ІФА всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані, контрольовані та регулярно обслуговуватися, щоб відповідати значенням, наведеним у розділі «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для обробки рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена, приділяючи особливу увагу, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для видачі зразків та промивання. Ефект перенесення повинен бути вивчений і контрольований, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекомендується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за пробіг.
7. Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком.
3. Переконайтеся, що Хромоген (ГМВ) безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи його невеликий об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.
4. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролило рідини всередині коробки (основний контейнер).
5. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
6. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
7. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім обережно перемішайте на вортексі всі рідкі реагенти.
8. Встановіть інкубатор ІФА на +37 °C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивки, як повідомляється в конкретному розділі.
9. Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
10. Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
11. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
12. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
13. У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче, з обережністю, щоб підтримувати однаковий час інкубації для всіх зразків під час тестування.

1. Розведіть зразки 1:101, додавши 1 мл (ml) Розчинника зразка в одноразову пробірку, а потім 10 мкл (μl) зразка; перемішайте на вортексі перед використанням. Не розбавляйте Контролі, оскільки вони готові до використання.
2. Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Залиште лунку A1 порожньою для операції бланкування. Зберігайте решту смужок в пакеті з осушувачем при 2..8 °C (°C), герметично запечатаними.
3. Додайте 50 мкл (μl) Нейтралізуючого Реагенту у всі лунки для зразків; не заповнюйте лунки A1 та Контрольні лунки.

Важлива примітка: Нейтралізуючий Реагент здатний блокувати хибнопозитивні реакції через РФ. Позитивні зразки у внутрішніх панелях контролю якості можуть бути виявлені негативними, якщо такі зразки були позитивні при використанні IVD, що не мала жодної реакції блокування РФ.

4. Внесіть піпеткою 100 мкл (μl) Негативного Контролю в трьох примірниках і 100 мкл (μl) Позитивного Контролю в одному екземплярі у відповідні лунки. Потім внесіть 100 мкл (μl) зразків у відповідні лунки для зразків.
5. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при + 37 °C (°C)**.

Важливе зауваження: Смужки повинні бути заклеєні клейкою ущільнювальною фольгою, що постачається з набором, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

6. Промийте мікропланшет, як описано в розділі I.3.
7. Піпетуйте 100 мкл (μl) Ферментного Кон'югату в усі лунки, окрім лунки A1. Перевірте, чи правильно додано реагент. Інкубуйте мікропланшет при **+37 °C (°C) протягом 60 хвилин**.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, наповненим Кон'югатом. Може відбутися забруднення.

8. Промийте мікропланшет, як описано в розділі I.3.
9. У кожен лунку внесіть піпеткою 100 мкл (μl) Хромоген/Субстрат, включаючи лунку A1 для бланкування. Перевірте, чи правильно

додано реагент. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі протягом 20 хвилин**.

Важливе зауваження: Не піддавайте сильному прямому освітленню. Можливо, буде створено високий фон.

- Піпетуйте 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 9.
- Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину при 450 нм (nm) (зчитування) та 620-630 нм (nm) (бланкування, обов'язкове), бланкуючи прилад на А1.

Важливі загальні зауваження:

- Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
- Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.

N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Нейтралізуючий реагент (тільки для зразків)	50 мкл (μl)
Контролі	100 мкл (μl)
Зразки розведені 1:101	100 мкл (μl)
1-а інкубація	60 хвилин
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
2-а інкубація	60 хвилин
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
TMB/H ₂ O ₂	100 мкл (μl)
3-я інкубація	20 хвилин
Температура	кімнатна
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

Нижче наведено приклад схеми розподілу:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S4											
B	NC	S5											
C	NC	S6											
D	NC	S7											
E	PC	S8											
F	S1	S9											
G	S2	S10											
H	S3	S11											

Легенда: BLK = Бланк NC = Негативний контроль PC = Позитивний контроль S = Зразок

O. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації проводиться на калібраторах та контрольній сироватці кожного разу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результати аналізу є відповідними.

Переконайтеся, що досягнуто наступних результатів:

Параметри	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 OD450 нм (nm)
Негативний контроль (NC)	< 0.150 OD450 нм (nm) після бланкування
Позитивний контроль (PC)	> 0.500 OD450 нм (nm)

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі і виконайте такі перевірки:

Проблема	Перевірити
Бланк-лунка > 0.100 OD450 нм (nm)	1. чи розчин Хромоген/Субстрат не був забруднений під час аналізу
Негативний контроль OD450 нм (nm) > 0.150	1. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в рамках попереднього кваліфікаційного дослідження; чи використовується відповідний миючий розчин, а перед використанням вошер був ним праймований; 2. чи в процедурі аналізу не було допущено помилки під час внесення Контролів; 3. чи не відбулось забруднення Контролю або лунок, де розподіл був здійснений, через розливання позитивних зразків або кон'югату; 4. чи мікропіпетки не забруднені позитивними зразками або кон'югатом; 5. чи голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.
Позитивний контроль OD450 нм (nm) < 0.500	1. чи процедура була правильно виконана; 2. чи під час внесення контролю не сталася помилка (внесення неправильного Контролю); 3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. чи не відбулося зовнішнього забруднення контролю.

Важлива примітка:

Аналіз слід проводити, виконуючи крок зчитування, описаний у розділі M, пункт 11.

P. РЕЗУЛЬТАТИ

Якщо тест виявляється дійсним, результати розраховуються на основі середнього значення OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm) Негативного контролю (NC) за допомогою граничного значення Cut-off (Co), визначеного за такою формулою:

$$\text{Cut-off} = \text{NC} + 0.250$$

Важлива примітка: Коли обчислення результатів виконується операційною системою автоматизованої робочої станції ІФА, переконайтеся, що для створення правильної інтерпретації результатів використовується правильна формула.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати випробувань інтерпретуються як співвідношення значення OD 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) зразка (S) і граничного значення Cut-off (Co), або S/Co, відповідно до наступної таблиці:

S/Co	Інтерпретація
< 1.0	Негативний
1.0 – 1.2	Двозначний
> 1.2	Позитивний

Негативний результат свідчить про відсутність у пацієнта антитіл IgM до EBV.

Будь-якого пацієнта, який показує неоднозначний результат, слід повторно перевірити на другому зразку, взятому через 1-2 тижні після першого зразка.

Позитивний результат вказує на триваючу інфекцію EBV, тому пацієнта слід лікувати відповідно.

Важливі примітки:

- Одних результатів EA IgM недостатньо для встановлення чіткого діагнозу інфекції EBV. Необхідно провести інші тести на EBV (постачаються Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. під № EBNG.CE, EAG.CE, EBNM.CE, VCAG.CE, VCAM.CE та ПЛР у реальному часі на EBV).

2. Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
3. Коли результати випробувань передаються з лабораторії до іншого відділення, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
4. Діагноз повинен поставлений і переданий пацієнту лікарем з відповідною кваліфікацією.

Нижче наведено приклад розрахунку (дані, отримані як крок читання, описаний у розділі М, пункт 11):

Наведені нижче дані не можна використовувати замість реальних цифр, отриманих користувачем.

Негативний контроль:	0.100 – 0.120 – 0.080 OD450 нм (nm)
Середнє значення:	0.100 OD450 нм (nm)
Нижче 0.150 –	Приймається
Позитивний контроль:	1000 OD450 нм (nm)
Більше 0.500 –	Приймається
Cut-off	= 0.100 + 0.250 = 0.350
Зразок 1:	0.080 OD450 нм (nm)
Зразок 2:	1800 OD450 нм (nm)
Зразок 1 S/Co < 1.0	= негативний
Зразок 2 S/Co > 1.2	= позитивний

Р. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка ефективності була проведена у зовнішньому клінічному центрі на панелях негативних та позитивних зразків з посиланням на комерційний набір.

1. Межа виявлення

Європейське співтовариство досі не визначило жодного міжнародного стандарту для виявлення антитіл EA IgM.

За його відсутності визначено внутрішній золотий стандарт (або IGS), отриманий від пацієнта з анамнезом інфекції мононуклеозу, щоб забезпечити постійну та чудову чутливість пристрою.

2. Діагностична Чутливість та Специфічність

Діагностичну чутливість досліджували на 88 позитивних зразках, попередньо протестованих референсним набором європейського виробництва, який використовується в лабораторії. Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів, які перенесли гострий мононуклеоз.

Діагностична специфічність була визначена на 352 негативних зразках від нормальних осіб, класифікованих як негативні за допомогою референсного набору.

Крім того, група зразків, що можуть інтерферувати (RF+, не пов'язані вірусні інфекції тощо), була перевірена без помилкових результатів.

Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватки. Жодної помилкової реактивності через метод приготування зразка не спостерігалось.

Заморожені зразки також були перевірені, щоб визначити, чи заморожування зразків перешкоджає виконанню тесту.

На чистих зразках і зразках без частинок ніяких інтерференцій не спостерігалось.

Оцінка ефективності надала такі значення:

Чутливість	> 98 %
Специфічність	> 98 %

3. Відтворюваність

Дослідження, проведене на трьох зразках різної реактивності анти-EA IgM, досліджених у 16 повторях у трьох окремих пробігах, показали загальні значення CV% нижче 15%, залежно від показань OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm).

Отримана варіабельність не призвела до неправильної класифікації зразків.

5. ОБМЕЖЕННЯ

Помилкова позитивність оцінюється як менше ніж 2% від нормальної популяції, в основному через високі титри ревматоїдного фактора.

Заморожені зразки, що містять частинки або агрегати фібрину, можуть давати хибнопозитивні результати.

Р. ЛІТЕРАТУРА

1. Engvall E. and Perlmann P. J.Immunochimistry 1971 : 8, 871-874.
2. Engvall E. and Perlmann P. J.Immunol. 1971 : 109, 129-135.
3. Remington J.S. and Klein J.O. In "Infectious diseases of the fetus and newborn infant". (1966) Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
4. Volk W.A. In "Essential of Medical Microbiology". (1982) Second edition pp 729. G.B.Lippincott Co., Philadelphia, New York, S.José, Toronto.
5. Davidsohn I. and Lee C.L. In "The clinical serology of infectious mononucleosis" Infectious mononucleosis (1969). Carter R.L. and Pnman H.G. Edrs, Oxford, Blackwell Scientific Publications, pp 177-200.
6. Evans A.S. et al. N.Engl.J.Med. 1968 : 278, 1121-1127.
7. Henle G. et al. Int.J.Cancer. 1976 : 17, 1-7.
8. Henle G. et al.. J.Infect.Dis.. 1974 : 130, 231-239.
9. Henle G. et al.. Cancer. 1974 : 34, 1368-1374
10. Miller G. et al.. Prog.Med.Virol. 1975 : 20, 84-112.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила EN ISO 13485. Кожна партія піддається контролю якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК

DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy
Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it

ТОВ ДІА.ПРО

Діагностік Біопробс с.р.л.
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан (MI) Італія
тел.: +39 02 2700 7161
факс: +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

