

## НАБІР РЕАГЕНТІВ

# ВІРУС ЕПШТЕЙН-БАРРА ЯДЕРНИЙ АНТИГЕН-1 IgG ELISA

## EBV-EBNA-1 IgG ELISA

Каталог. №: **EIA-4246**

Дата випуску інструкції: **07-2016**  
Версія **8.0**



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

### 1 ВСТУП

#### 1.1 Призначення

Даний набір являє собою імуноферментний аналіз для **якісного та напівкількісного** визначення антитіл класу IgG до ядерного антигену 1-го типу вірусу Епштейн-Барра (EBV-EBNA-1) в сироватці або плазмі людини.

**Цей тест призначений тільки для діагностики в лабораторних умовах.**

#### 2 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Даний набір являє собою твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA). Мікротитрові лунки як тверда фаза покриті рекомбінантними EBV ядерними антигенами 1-го типу.

**Розведені зразки пацієнта і готові до використання контролю** пікетуються в ці лунки. Під час інкубації EBNA-1-специфічні антитіла позитивних зразків і контролів зв'язуються з іммобілізованими антигенами.

Після стадії промивки для видалення незв'язаних зразків і контрольного матеріалу в лунки вносяться кон'юговані з пероксидазою хрому анти-людські антитіла IgG. Під час другої інкубації цей анти-IgG кон'югат специфічно зв'язується з IgG-антитілами, що призводить до утворення ферментно-зв'язаних імунних комплексів.

Після другого етапу промивання для видалення незв'язаного кон'югату сформовані імунні комплекси (в разі позитивного результату) визначаються в ході інкубації з субстратом ТМБ з утворенням синього кольору. Синій колір змінюється на жовтий шляхом зупинки ферментної реакції індикатора з сірчаною кислотою.

Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості EBNA-1-специфічних IgG антитіл в зразку пацієнта.

Поглинання при 450 нм зчитується за допомогою ІФА рідера.

#### 3 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Набір призначений тільки для in vitro діагностики. Тільки для професійного використання.
- Перед початком дослідження прочитайте інструкцію повністю й уважно. Використовуйте дійсну версію інструкції, прикладену до набору. Переконайтеся, що вам все зрозуміло.
- Всі реагенти цього набору, які містять сироватку або плазму людини, були протестовані і показали негативний результат на HIV I/II, HBsAg and HCV за методами схваленим FDA. Однак, не існує методів, що гарантують повну відсутність цих речовин. Тому, всі продукти людської крові, включаючи зразки сироватки, повинні вважатися потенційно небезпечними.
- Уникайте контакту зі стоп розчином - 0.2 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Це може викликати подразнення шкіри або опіки. При контакті промити великою кількістю води.
- Розчин субстрату ТМБ має подразнюючий ефект на шкіру та слизові. У разі контакту, промийте очі з великим об'ємом води і шкіру з милом і великою кількістю води. Промийте забруднені об'єкти перед повторним використанням. У разі вдихання реагентів, виведіть людини на свіже повітря.
- Мікротитровий планшет складається зі смужок, які відриваються. Невикористані лунки повинні зберігатися при 2-8 °C в пакеті з фольги і використовуватися з рамкою, що надається.
- Піпетування зразків та реагентів повинне здійснюватися якомога швидше і з однаковими часовими інтервалами. Впевніться, що необхідні реагенти, матеріали та пристрої готові перед початком аналізу.
- Використовуйте резервуари тільки для окремих реагентів. Це особливо стосується субстрату. Використовуючи резервуар для дозування розчину субстрату, який раніше використовувався для розчину кон'югату, може призвести до забарвлення розчину.

- Змішуйте вміст лунок ретельно, щоб забезпечити хороші результати випробувань. Не використовуйте повторно мікропланшет.
- Не дозволяйте лункам висохнути; додавайте реагенти негайно після завершення стадії ополіскування.
- Дозволити реагентам нагрітися до кімнатної температури (21-26 °C) перед початком випробування. Температура буде впливати на показання оптичної щільності аналізу. Проте, значення для зразків пацієнтів не будуть порушені.
- Ніколи не піпетувати ротом і уникайте контакту реагентів і зразків зі шкiрою і слизовими оболонками.
- Не палити, не їсти, не пити і не застосовувати косметику в тих місцях, де обробляються зразки або реагенти набору.
- Одягати одноразові латексні рукавички при роботі зі зразками і реагентами. Мікробне забруднення реагентів чи зразків може давати помилкові результати.
- Роботи зі зразками та реагентами повинні здійснюватися відповідно до процедур, визначених відповідними національними правилами біологічної безпеки.
- Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
- Всі зазначені обсяги повинні бути виконані відповідно до протоколу. Оптимальні результати випробувань будуть отримані тільки при використанні каліброваних піпеток і зчитувачів мікропланшета.
- Не слід змішувати або використовувати компоненти з наборів з різними номерами лотів. Рекомендується не змінювати місцями лунки різних пластин навіть одного і того ж лоту. Набори можуть транспортуватися або зберігатися в різних умовах і зв'язуючі характеристики пластин можуть давати дещо інші результати.
- Хімікати і приготовлені або використані реагенти повинні розглядатися як небезпечні відходи.
- Для отримання інформації про небезпечні речовини, включені в набір, будь ласка, зверніться до Паспорта безпеки. Паспорти безпеки для даного продукту надаються за запитом безпосередньо від DRG.

#### 4 КОМПОНЕНТИ НАБОРУ

##### 4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Лунки мікропланшета**, 12 x 8 (відірвні) смужки, 96 лунок; Лунки покриті рекомбінантним EBV ядерним антигеном 1 типу. (вкл. 1 тримач для стрипів і 1 плівку для накривання)
2. **Розчинник для зразків\***, 1 флакон, 100 мл, готовий до використання, жовтого кольору; pH 7,2 ± 0,2.
3. **Позитивний Контроль\***, 1 флакон, 2,0 мл, готовий до використання; жовтого кольору, червоний ковпачок.
4. **Негативний Контроль\***, 1 флакон, 2,0 мл, готовий до використання; жовтого кольору, жовтий ковпачок.
5. **Cut-off Контроль\***, 1 флакон, 2,0 мл, готовий до використання; жовтого кольору, чорний ковпачок.
6. **Ферментний кон'югат\***, 1 флакон, 20 мл, готовий до використання, червоного кольору, антитіла до людського IgG, кон'югованого з пероксидазою хрому.
7. **Розчин субстрату**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, тетраметилбензидин (ТМБ).
8. **Стоп-розчин**, 1 флакон, 14 мл, готовий до використання, містить 0.2 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Уникайте контакту зі стоп-розчином. Це може викликати подразнення шкіри і опіки.
9. **Промивний розчин\***, 1 флакон, 30 мл (Концентрат 20X на 600 мл), pH 6.5 ± 0.1 дивіться розділ «Приготування реагентів».

\*містять не ртутний консервант

##### 4.1.1 Матеріали, що не постачаються, але є необхідними

- Мікротитровий відкалібрований рідер (450/620 нм ± 10 нм).
- Відкалібровані регульовані точні мікропіпетки.
- Інкубатор 37 °C
- Ручне або автоматичне обладнання для промивки лунок
- Вортекс
- Деіонізована або (свіжо) дистильована вода
- Таймер
- Абсорбуючий папір

##### 4.2 Зберігання та стабільність набору

При зберіганні при температурі 2-8 °C активність реагентів буде збережена до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати.

Відкриті реагенти та лунки повинні зберігатися при 2-8 °C. Мікролунки повинні зберігатися при 2-8 °C. Після відкриття мішечка із фольги треба знову його герметично закрити.

Відкритий набір стабільний 2 місяців при зберіганні, як вказано вище.

### 4.3 Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти та потрібну кількість смужок до кімнатної температури.

#### Промивний розчин

Розвести промивний розчин **1+19** (наприклад, 10 мл + 190 мл) свіжою очищеною від бактерій редистильованою водою. Цей розбавлений розчин для промивання має значення рН 7.2 ± 0.2.

Витрата: ~ 5 мл на визначення.

Кристали в розчині зникають при нагріванні до 37 °С на водяній бані.

Переконайтеся, що кристали повністю розчиняються перед використанням.

Розведений розчин для промивання стабільний протягом 4 тижнів при температурі 2-8 °С.

### 4.4 Утилізація набору

Знищення набору повинно проводитись відповідно до вимог техніки безпеки. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Листі Даних Безпеки.

### 4.5 Пошкодження набору

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника впродовж одного тижня після отримання виробу. Окремі пошкоджені компоненти не слід використовувати.

## 5 ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Сироватка або плазма (ЕДТА-, гепаринова або цитратна\* плазма) можуть використовуватись в даному аналізі. (Якщо \*цитратна плазма використовується, результати можуть бути трохи нижче.)

Не слід використовувати гемолітичні, жовтяничні або ліпемічні зразки.

### 5.1 Забір Зразка

#### Сироватка:

Проведіть забір крові венепункцією (напр. Sarstedt Monovette для сироватки); дозвольте їй згорнутись; і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного зсідання крові. Пацієнтам, які проходять терапію антикоагулянтами, може знадобитися більше часу для зсідання крові.

#### Плазма:

Цільна кров повинна бути зібрана в центрифужні пробірки, що містять антикоагулянт (наприклад, Sarstedt Monovette з відповідною підготовкою плазми) і центрифугована відразу після збору.

### 5.2 Підготовка та зберігання зразків

Зразки закрити кришками і зберігати до 5 днів при 2-8 °С перед аналізом. Зразки, які зберігаються на протязі більш тривалого часу мають бути заморожені тільки один раз при температурі від -20 °С перед аналізом. Відталі зразки повинні бути кілька разів перевернуті перед аналізом.

### 5.3 Розведення зразків

До аналізу розбавити кожен зразок пацієнта **1+100 Розчином для Розведення Зразків**; наприклад 10 мкл зразка + 1 мл Розчину для Розведення Зразків. **Добре перемішати і інкубувати протягом 15 хвилин при кімнатній температурі, знову перемішати.**

**Будь ласка, зверніть увагу:** Контролі готові до використання і не потребують розведення!

## 6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

### 6.1 Загальні зауваження

- **Доведіть всі реагенти, зразки та контролі до кімнатної температури перед початком дослідження!**
- Після початку дослідження всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком дослідження необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакові інтервали часу.
- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.
- Закрийте флакони з реагентами щільно відразу після використання, щоб уникнути випаровування і мікробного забруднення.
- Щоб уникнути перехресного забруднення і помилково завищених результатів піпетувати зразки пацієнтів і вносити кон'югат без розбризкування на дно лунок.
- Протягом інкубації при 37 °С накривати мікротитрові смужки фольгою, щоб уникнути випаровування.

### 6.2 Процедура дослідження

До початку аналізу розведіть *Промивний Розчин*, **підготуйте зразки пацієнтів, як описано в пункті 5.3** та підготуйте **схему розподілу та ідентифікації**, що поставляється в наборі для всіх зразків і контролів.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитрових лунок у штативі.

Будь ласка, розмістіть щонайменше:

1 лунку	(наприклад, А1)	для бланка субстрату,
1 лунку	(наприклад, В1)	для <i>Нег. Контролю</i> ,
2 лунки	(наприклад, С1+D1)	для <i>Cut-off Контролю</i>
1 лунку	(наприклад, Е1)	для <i>Поз. Контролю</i> .

Користувач вирішує, чи проводити визначення контролів і зразків пацієнтів в двох примірниках.

2. Внести  
**100 мкл *Нег. Контролю*** в лунку В1  
**100 мкл *Cut-off Контролю*** в лунки С1 і D1  
**100 мкл *Поз. Контролю*** в лунку Е1 і  
**100 мкл** кожного розведеного зразка з новими одноразовими наконечниками у відповідні лунки.  
Залиште лунку А1 для бланка субстрату!  
3. Накрити лунки плівкою, що поставляється в наборі. Інкубувати протягом **60 хвилин при 37 °С**.  
4. Вилийте різко вміст лунок.  
Промийте лунки **5 разів** розведеним *Промивним Розчином (300 мкл на лунку)*. Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.  
**Важливе зауваження:**  
Чутливість і точність цього аналізу залежать від правильності проведення процедури промивання!  
5. Внесіть **100 мкл *Ферментного Кон'югату*** в кожну лунку, **крім А1**.  
6. Інкубуйте **30 хвилин при кімнатній температурі (20-25 °С)**.  
*Не піддавати впливу прямих сонячних променів!*  
7. Вилийте різко вміст лунок.  
Промийте лунки **5 разів** розведеним *Промивним Розчином (300 мкл на лунку)*. Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.  
8. Додайте **100 мкл *Розчину Субстрату*** в кожну лунку.  
9. Інкубуйте **15 хвилин при кімнатній температурі (20-25 °С) в темноті**.  
10. Зупиніть ферментативну реакцію, додавши **100 мкл *Стоп Розчину*** в кожну лунку.  
Будь-яке блакитне забарвлення, яке проявилось під час інкубації, змінюється на жовте.  
**Примітка:** Високо позитивні зразки пацієнтів можуть мати темний осад хромогену!  
11. Визначте абсорбцію (ОЩ) кожної лунки при **450/620 нм** за допомогою мікротитрового планшет-рідера **протягом 30 хвилин** після додавання *Стоп Розчину*.

### 6.3 Вимірювання

**Налаштуйте** мікропланшетний зчитувач **на нуль**, використовуючи **субстрат бланку в лунці А1**.

Якщо - з технічних причин - рідер не може бути налаштований на нуль використовуючи субстрат бланку в лунці А1, відняти значення абсорбції лунки А1 з усіх інших значень абсорбції, щоб отримати достовірні результати!

**Виміряти абсорбцію** у всіх ланках при довжині хвилі **450 нм** і записати значення абсорбції для кожного контролю і зразка пацієнта в плані розподілу та ідентифікації.

Рекомендується подвійне зчитування довжини хвилі 620 нм в якості еталонної довжини хвилі.

Там, де це може бути застосовано, **розрахувати середнє значення абсорбції** всіх дублів.

## 7 РЕЗУЛЬТАТИ

### 7.1 Оцінка роботи тесту

Тест **можже** вважатися дійсним при дотриманні наступних умов:

<b>Субстрат Бланк в А1:</b>	Значення абсорбції <b>нижче 0.100</b>
<b>Нег. Контроль в В1:</b>	Значення абсорбції <b>нижче 0.200</b>
<b>Cut-off Контроль в С1/D1:</b>	Значення абсорбції <b>між 0.350 - 0.850</b>
<b>Поз. Контроль в Е1:</b>	Значення абсорбції <b>між 0.650 - 3.000</b>

### 7.2 Розрахунок

Середнє значення абсорбції **Cut-off Контролю [CO]**

Обчислити середнє значення абсорбції двох (2) визначень **Cut-off Контролю** (наприклад, в С1/D1).

**Приклад:**  $(0.44 + 0.46) / 2 = 0.45 = CO$

### 7.3 Інтерпретація

#### ПОЗИТИВНИЙ

Значення (середні) оптичної щільності пацієнта більше ніж на 10% вище CO  
(Середня  $OD_{\text{пацієнта}} > 1.1 \times CO$ )

#### СІРА ЗОНА

Значення (середні) оптичної щільності пацієнта від 10% вище до 10% нижче CO

Повторити тест через 2-4 тижні - з **новими** зразками пацієнтів

$(0.9 \times CO \leq \text{Середня } OD_{\text{пацієнта}} \leq 1.1 \times CO)$

Результати в повторному тесті знову в сірій зоні ⇒ **НЕГАТИВНИЙ**

#### НЕГАТИВНИЙ

Значення (середні) оптичної щільності пацієнта більше ніж на 10% нижче CO  
(Середня  $OD_{\text{пацієнта}} < 0.9 \times CO$ )

#### 7.3.1 Результати в DRG Одиницях [DU]

Значення (середнє) оптичної щільності пацієнта  $\times 10 / CO = [\text{Одиниці DRG Одиниці} = DU]$

Приклад:  $1.580 \times 10 / 0.45 = 35 DU$

#### Інтерпретація результатів

Значення Cut-off: 10 DU  
Сіра зона: 9 - 11 DU  
Негативний: < 9 DU  
Позитивний: > 11 DU

### 8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати контролі згідно з державними і місцевими правилами. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролі і нормального рівня, і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, вказані в даному сертифікаті відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також рекомендується використовуватись національні і міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають в установленні границі матеріалів контролю, результати являються не достовірними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

### 9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

#### 9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться між 0.62 - 60 DU/мл.

#### 9.2 Аналітична чутливість

Аналітична чутливість DRG ELISA розраховувалася шляхом додавання 2 стандартних відхилень від середнього значення 20 повтор аналізу негативного контролю і становить 0.62 DU/мл ( $OD_{450} = 0.033$ ).

#### 9.3 Діагностична специфічність

Діагностична специфічність визначається як ймовірність аналізу дати негативний результат при відсутності специфічного аналізу. (Виявлено в порівнянні з методом Virion-Serion ELISA, з трьома лотами DRG ELISA. Були аналізовані 92 зразки, з них 37 негативних).

Це становить 100% для всіх трьох лотів DRG.

#### 9.4 Діагностична чутливість

Діагностична чутливість визначається як ймовірність аналізу дати позитивний результат в присутності специфічного аналізу. (Виявлено в порівнянні з методом Virion-Serion ELISA, з трьома лотами DRG ELISA. Були аналізовані 92 зразки, з них 55 позитивних).

Це становить 100% для всіх трьох лотів DRG.

#### 9.5 Порівняння методів

DRG EBV (EBNA-1) IgG ELISA порівнювали з Virion-Serion EBV (EBNA-1) IgG ELISA. 92 зразки сироватки були аналізовані.

n= 92		Virion-Serion	
		pos.	neg.
DRG ELISA Lot 1	pos.	55	0
	neg.	0	37

Узгодження: 100%

### 9.6 Відтворюваність

**9.6.1 Точність в аналізі** тесту DRG EBV-EBNA-1 IgG ELISA визначали за допомогою 20х вимірювань 12 зразків сироватки, що охоплюють весь діапазон вимірювання.

Sample	Mean $OD_{450}$	Intra-Assay CV (%)	n
1	0,21	5,26	20
2	0,31	4,78	20
3	0,21	4,13	20
4	0,92	2,36	20
5	0,82	4,36	20
6	0,65	3,78	20
7	1,40	2,49	20
8	1,40	2,37	20
9	1,11	1,58	20
10	1,55	4,34	20
11	1,62	2,51	20
12	1,52	3,74	20

**9.6.2 Точність між аналізами** тесту DRG EBV-EBNA-1 IgG ELISA визначали за допомогою 3 зразків з 2 наборами в 10 незалежних вимірюваннях по 2 дублі кожен.

Зразок	Середнє $OD_{450}$	КВ, %	К-сть
1	1.45	<b>4.17</b>	40
2	0.22	<b>14.26</b>	40
3	1.04	<b>4.87</b>	40

### 10. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Бактеріальне забруднення або повторні цикли заморожування-відтавання зразка можуть вплинути на значення абсорбції.

У пацієнтів з імунodefіцитом і новонароджених серологічні дані мають обмежене значення.

### 11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

#### 11.1 Достовірність результатів

Дослідження необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів. Важливо завжди включати в рамках процедури випробування достатню кількість контролів для оцінки правильності та точності тесту.

Результати дослідження вважаються достовірними, якщо контролі знаходяться в указаних межах і якщо інші параметри дослідження також відповідають характеристикам процедури.

#### 11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного дослідження і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.

Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

#### 11.3 Відповідальність

Будь-які зміни дослідження чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах дослідження. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться до відповідальності виробника.



#### **ВИРОБНИК**

ДРГ Інструментс ГмбХ  
вул. Фраунберг 18, 35039  
м. Марбург, Німеччина  
Тел: +49(0)64 21/170 00  
Факс: +49(0)64 21/17 00 50  
[www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
e-mail: [drq@drq-diagnostics.de](mailto:drg@drq-diagnostics.de)



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

