

# НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgG ДО КАПСИДНОГО АНТИГЕНУ ЕПШТЕЙН-БАРР ВІРУСУ

## VCA IgG

Кат. №: **VCAG.CE**

Дата випуску інструкції: **2020/01**  
Версія: **8**



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

**Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного/якісного визначення антитіл IgG до капсидного антигену вірусу Епштейн-Барр в сироватці та плазмі людини**

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

### А. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного/якісного визначення антитіл IgG до капсидного антигену вірусу Епштейн-Барр у плазмі та сироватці людини.

Тільки для діагностики in vitro.

### В. ВСТУП

Вірус Епштейн-Барр або EBV є основним етіологічним агентом інфекційного мононуклеозу, а також фактором, що сприяє етіології лімфоми Беркитта 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, у 50-70% молодих людей, які перенесли первинну інфекцію EBV, виявляють легкі або важкі захворювання. EBV може викликати стійку, приховану інфекцію, яка може бути реактивована під час 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 повторно активувати EBV інфекції. Таким чином, виявлення специфічних IgG, IgM та IgA антитіл до EBV до основних імунодомінантних антигенів (головним чином ядерного антигену або EBNA та вірусного капсидного антигену або VCA) стало важливим і корисним визначенням для моніторингу та спостереження за пацієнтами, інфікованими EBV.

### С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Щоб позбутися перехресних реакцій з іншими вірусами того ж семейства, мікропланшети покривають очищеним антигеном VCA, що містить імунодомінантні та специфічні послідовності, здатні забезпечити аналіз з найвищою специфічністю та чутливістю.

Під час 1-ї інкубації тверду фазу обробляють розведеними зразками, і IgG до VCA захоплюються антигенами, якщо вони присутні.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка у 2-й інкубації зв'язані IgG до VCA виявляються шляхом додавання антитіла до hIgG, міченого пероксидазою (HRP). Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості антитіл IgG до VCA, присутніх у зразку.

Тому IgG у зразку можна кількісно визначити за допомогою стандартної кривої, відкаліброваної в довільних одиницях на мілілітр (arbU/мл), оскільки немає міжнародного стандарту.

### Д. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

#### 1. Мікропланшет MICROPLATE

12 смужок x 8 мікролунок, покритих афінно очищеним нативним антигеном VCA. Планшети запаковані в пакет з осушувачем.

Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітисся до кімнатної температури; повторно закрийте невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігайте при 4°C (°C).

#### 2. Калібрувальна крива: CAL N° ...

Готова до використання та кольорова стандартна крива в діапазоні: 4 мл (ml) CAL1 = 0 arbU/мл

4 мл (ml) CAL2 = 5 arbU/мл  
2 мл (ml) CAL3 = 10 arbU/мл  
2 мл (ml) CAL4 = 20 arbU/мл  
2 мл (ml) CAL5 = 50 arbU/мл  
4 мл (ml) CAL6 = 100 arbU/мл.

Стандарти відкалібровані за внутрішнім золотим стандартом або IGS, оскільки міжнародний не визначено.

Містить білки людської сироватки, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0,1% Твін 20, 0,09% Na-азид і 0,045% ProClin 300 як консерванти. Стандарти синього кольору.

#### 3. Контрольна сироватка: CONTROL .... ml

1 флакон. Містить білки сироватки великої рогатої худоби, антитіла IgG людини до VCA в концентрації 20 arbU/мл+20%, 0,2 мг/мл (mg/ml) сульфату гентаміцину та 0,045% ProClin 300 як консерванти.

#### 4. Концентрат буферу для промивання: WASHBUF 20X

1x60 мл/пляшку (ml/bottle) 20-кратного концентрованого розчину. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатного буферу pH 7.0 +/-0.2, 0,05% Твін 20 і 0,045% ProClin 300.

#### 5. Ферментний кон'югат: CONJ

1x16 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання та маркований червоним кольором. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому поліклональні антитіла до IgG людини, 5% BSA, 10 мМ (mM) трис-буфер pH 6.8 +/-0.1, 0,045% ProClin 300 і 0,02% гентаміцин-сульфат як консерванти.

#### 6. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл/флакон (ml/vial). Містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатний буферний розчин з pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксиду, 0,03% тетраметилбензидину (або ТМБ) і 0,02% перекису водню (або H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**Примітка: Зберігати в захищеному від світла місці, оскільки чутливий до сильного освітлення.**

#### 7. Сірчана кислота: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M

1x15 мл/пляшка (ml/vial). Містить 0.3 M розчину H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

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

#### 8. Розчинник для зразка: DILSPE

2x60мл/флакон (ml/vial). Містить 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0,1% Твін 20, 0,09% Na-азид і 0,045% ProClin 300 як консерванти. Використовується для розведення зразка.

#### 9. Ущільнювальна фольга для планшети 2 шт.

#### 10. Вкладиш інструкції 1 шт.

### Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (1000, 100 та 10 мкл (μl) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу EIA (подвійної дистиляції або деіонізації, оброблена деревним вугіллям, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
3. Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
4. Абсорбуючі паперові серветки.
5. Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА (сухий або вологий), здатний забезпечити температуру +37 °C (°C) (допуск +/-0.5°C (°C)).
6. Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
7. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
8. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

### Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. 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 біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.

3. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечно та ефективно.
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 (ТМБ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
5. Після отримання, зберігайте набір при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури щодо 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, проведене на відкритому наборі, не вказало на будь-яку істотну втрату активності до шести 6 використання пристрою та до 6 місяців.
11. Ставтеся до всіх зразків як до потенційно інфекційних. З усіма зразками сироватки людини слід поводитися на рівні біобезпеки 2, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, відповідно до того, що повідомляється у публікації Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека мікробіологічних та біомедичних лабораторій», вид. 1984 р.
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 утворились 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 (min).
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 подразником. 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. Вплив на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові, настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
3. Гемолізовані («червоні») та явно гіперліпемічні («молочні») зразки слід утилізувати, оскільки вони можуть дати помилкові результати. Зразки, що містять залишки фібрину або важкі частинки або мікробні нитки та тіла, слід утилізувати, оскільки вони можуть привести до помилкових результатів.

4. Сироватку та плазму можна зберігати при + 2 ° ... + 8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно вийняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморозжувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
5. Якщо присутні частинки, центрифугуйте при 2.000 об./хв. (rpm) протягом 20 хв. (min) або краще, фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8μ для очищення зразка перед тестуванням.
6. Зразки, чия концентрація антитіл IgG до VCA очікується вище, ніж 100 arbU/мл, слід розбавити перед використанням у співвідношенні 1:10 або 1:100 у калібраторі 0 arbU/мл. Розведення необхідно проводити в чистих одноразових пробірках шляхом розведення 50 мкл (μl) кожного зразка 450 мкл (μl) Cal 0 (1:10). Потім 50 мкл (μl) розведення 1:10 розбавляють 450 мкл (μl) Cal 0 (1:100). Ретельно перемішайте пробірки на вортексі, а потім перейдіть до етапу розведення, описаного в розділі M.

## H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

### Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету нагрітися до кімнатної температури (приблизно 1 год). Перевірте, щоб осушувач не став темно-зеленим, що вказує на дефект зберігання.

У такому випадку зателефонуйте в службу підтримки клієнтів Dia.Pro. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий мішечок з осушувачем, щільно застебнути на блискавку і зберігати при +2°-8°C (°C).

**Важлива примітка:** Після першого відкриття смужки що залишилися стабільні, доки індикатор вологості всередині пакета з осушувачем не зміниться з жовтого на зелений.

### Калібрувальна крива:

Готовий до використання. Добре перемішайте на вортексі перед використанням.

### Контрольна сироватка:

Додайте до ліофілізованого порошку об'єм води класу ELISA, зазначений на етикетці; дайте повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі.

**Примітка:** Контроль після розчинення не є стабільним. Зберігати в замороженому вигляді в аликвотах при -20°C (°C).

### Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням 20X концентрований розчин слід розбавити подвійно дистильованою водою і обережно перемішати обертанням з денця на кришку. Під час приготування уникайте спінювання, оскільки наявність бульбашок може вплинути на ефективність циклів миття.

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

### Ферментний Кон'югат:

Готовий до використання. Добре перемішайте на вортексі перед використанням.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Якщо цей компонент потрібно перенести, використовуйте лише пластикові, можливо стерильні одноразові контейнери.

### 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.

### Розчинник для зразків:

Готовий до використання компонент. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

### 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 **Н-фрази**:

**H315** - Викликає подразнення шкіри.

**H319** - Викликає сильне подразнення очей.

Попереджувальні **Р-фрази**:

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

**P302+P352** - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: 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.

## І. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

- Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 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 правдивість +/- 2%. Також слід регулярно проводити дезактивацію розливів або залишків компонентів набору.
- Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубації підходять як сухі інкубатори, так і водяні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА.
- 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 праймувати розведеним Промивним Розчином. Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 M NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку (µl/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.
- Час інкубації має допуск ± 5%.
- Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартними характеристиками повинні бути (а) пропускну 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.
- 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 О «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 подачі рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена. Особливу увагу потрібно приділити, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для дозування та промивання. Це потрібно вивчити та контролювати, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекомендується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за один запуск.
- 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

- Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
- Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком.
- Переконайтеся, що Хромоген (ТМБ) безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.
- Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролито рідини всередині коробки. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
- Розведіть вміст Контрольної сироватки як повідомляється.
- Розведіть увесь вміст 20-кратного концентрованого Розчину для промивання як описано вище.
- Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (приблизно 1 год), а потім обережно перемішайте на вортексі всі рідкі реагенти.
- Встановіть ІФА інкубатор на +37°C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи розведеним промивним розчином, згідно з інструкціями виробника. Установіть потрібну кількість циклів промивання, як зазначено в спеціальному розділі.
- Перевірте, що ІФА зчитувач увімкнено або переконайтеся, що він увімкнений принаймні за 20 хвилин до зчитування.
- Якщо використовується автоматизована робоча станція, увімкніть, перевірте налаштування та переконайтеся, що ви використовуєте правильний протокол аналізу.
- Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
- Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
- 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.

Набір також можна використовувати для кількісних і якісних визначень.

## M1. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ:

- Розведіть зразки 1:101 у відповідних пробірках для розчину (приклад: 1000 мкл (µl) Розчинника для Зразка + 10 мкл (µl) зразка). Не розбавляйте набір для Калібрування – Калібратори, оскільки вони готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
- Помістіть необхідну кількість Мікролунок у тримаач. Лунку A1 та B1 залишіть порожньою для бланкування.
- Додайте 100 мкл (µl) Калібрування та 100 мкл Контрольної Сироватки у двох примірниках. Потім додайте 100 мкл (µl) розведених зразків у кожну визначену лунку.
- Інкубуйте мікропланшет **протягом 60 хв при +37°C (°C)**.

**Важлива примітка:** *смужки повинні бути заклеєні клейкою плівкою, що входить до набору, тільки тоді, коли тест виконується вручну. Не накривайте смужки під час використання автоматичних інструментів ІФА.*

- Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як повідомлялося раніше (розділ I.3).
- Внесіть піпеткою 100 мкл (µl) Ферментного кон'югату в кожну лунку, за винятком A1 + B1 бланк-лунок, і накрийте герметичною плівкою. Переконайтеся, що цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, окрім A1 та B1.

**Важлива примітка:** *Будьте обережні, щоб не торкнутися внутрішньої поверхні лунки кінчиком піпетки під час видачі Ферментного кон'югату. Може відбутися забруднення.*

- Інкубувати мікропланшет **протягом 60 хв при +37°C (°C)**.
- Помити мікролунок, як повідомлялося у пункті 5.
- Внесіть піпеткою по 100 мкл (µl) суміші Хромоген/Субстрат у кожну лунку, включно з бланк-луною A1 та B1. Потім інкубуйте

мікропланшет при кімнатній температурі (18-24°C (°C)) протягом 20 хвилин.

**Важлива примітка:** Не надавайте сильному прямому освітленню. Може утворитися високий фон.

- Внесіть піпеткою 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти у всі лунки, щоб зупинити ферментативну реакцію, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 9. Додавання кислоти перетворить Позитивний контроль і позитивні зразки з блакитного на жовтий.
- Виміряйте інтенсивність кольору розчину в кожній лунці, як описано в розділі I.5, на фільтрі 450 нм (nm) (зчитування) і при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи інструмент на A1 та B1, або на обидвох.

## М2. ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Якщо потрібно лише якісне визначення, виконайте такі дії, як описано нижче:

- Розведіть зразки 1:101 у відповідних пробірках для розчину (приклад: 1000 мкл (μl) Розчинника для Зразка + 10 мкл (μl) зразка). Не розбавляйте набір для Калібрування – Калібратори, оскільки вони готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
- Помістіть необхідну кількість Мікролунок у тримач. Лунку A1 залишіть порожньою для бланкування.
- Додайте 100 мкл (μl) Калібратора 0 arbU/ml та Калібратора 5 arbU/ml у двох примірниках та Калібратора 100 arbU/ml в одному примірнику. Потім додайте 100 мкл (μl) розведених зразків у кожну визначену лунку.
- Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хв при +37°C (°C)**.

**Важлива примітка:** смужки повинні бути заклеєні клейкою плівкою, що входить до набору, тільки тоді, коли тест виконується вручну. Не накривайте смужки під час використання автоматичних інструментів ІФА.

- Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як повідомлялося раніше (розділ I.3).
- Внесіть піпеткою 100 мкл (μl) Ферментного кон'югату в кожну лунку, за винятком лунки A1 і накрийте герметичною плівкою. Переконайтеся, що цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, окрім A1.

**Важлива примітка:** Будьте обережні, щоб не торкнутися внутрішньої поверхні лунки кінчиком піпетки під час видачі Ферментного кон'югату. Може відбутися забруднення.

- Інкубувати мікропланшет протягом **60 хв при +37°C (°C)**.
- Помити мікролунок, як повідомлялося у пункті 5.
- Внесіть піпеткою по 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат у кожну лунку, включно з бланк-лункою. Потім інкубуйте мікропланшет **при кімнатній температурі (18-24°C (°C)) протягом 20 хвилин**.

**Важлива примітка:** Не надавайте сильному прямому освітленню. Може утворитися високий фон.

- Внесіть піпеткою 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти у всі лунки, щоб зупинити ферментативну реакцію, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 9. Додавання кислоти перетворить Позитивний контроль і позитивні зразки з блакитного на жовтий.
- Виміряйте інтенсивність кольору розчину в кожній лунці, як описано в розділі I.5, на фільтрі 450 нм (nm) (зчитування) і при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи інструмент на A1.

## 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 незначне самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.

## N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Калібратори	100 мкл (μl)
Контрольна сироватка (*)	100 мкл (μl)
Зразки розведені 1:101	100 мкл (μl)
<b>1-а інкубація</b>	<b>60 хв</b>
Температура	+37 °C (°C)
Етап промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
<b>2-а інкубація</b>	<b>60 хв</b>
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМБ/Н <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 мкл (μl)
<b>3-я інкубація</b>	<b>20 хв</b>
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm) /620-630 нм (nm)

### (\*) Важливі примітки:

- Контрольна сироватка (CS) не впливає на підрахунок результатів тесту.
- Контрольна сироватка (CS) використовується лише в тому випадку, якщо керівництво вимагає внутрішнього контролю якості лабораторії.

Нижче наведено приклад схеми розподілу для кількісного аналізу:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S1										
B	BLK	CAL4	S2										
C	CAL1	CAL5	S3										
D	CAL1	CAL5	S4										
E	CAL2	CAL6	S5										
F	CAL2	CAL6	S6										
G	CAL3	CS (*)	S7										
H	CAL3	CS (*)	S8										

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратор S = Зразок  
CS (\*) = Контрольна сироватка – обов'язкове

Нижче наведено приклад схеми розподілу для якісного аналізу:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S3	S11										
B	CAL1	S4	S12										
C	CAL1	S5	S13										
D	CAL2	S6	S14										
E	CAL2	S7	S15										
F	CAL6	S8	S16										
G	S1	S9	S17										
H	S2	S10	S18										

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратори S = Зразок

## O. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації здійснюється на контролях щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результати аналізу є такими ж кваліфікованими.

Переконайтеся, що такі дані збігаються:

Перевірка	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 значення ОЩ450 нм (nm)
CAL1 0 arbU/мл	< 0.150 ОЩ450 нм (nm) значення після бланкування Коефіцієнт варіації <30%
CAL 2 5 arbU/мл	ОЩ450нм >ОЩ450 нм (nm) CAL1 + 0.100
CAL 6 100 arbU/мл	ОЩ450 нм (nm) > 1.000

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

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі, а проведіть наступні перевірки:

Проблема	Перевірка
<b>Бланк-лунка</b> > 0.100 ОЩ450 нм (nm)	1. щоб розчин Хромогену/Субстрату не був забруднений під час аналізу
<b>CAL 1</b> <b>0 arbU/мл</b> >0.150 ОЩ450 нм (nm) після бланкування  Коефіцієнт варіації >30%	1. щоб процедури промивання та налаштування вошера були підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 2. що був використаний відповідний миючий розчин і вошер був праймований ним перед використанням; 3. не було допущено жодної помилки в процедурі аналізу (видача позитивного калібратора замість негативного; 4. що жодного забруднення негативного калібратора або його лунок не відбулося через розливи позитивних зразків або ферментний кон'югат; 5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом 6. що голки вошера не заблоковані або частково не забруднені
<b>CAL 2</b> <b>5 arbU/мл</b>  ОЩ450нм < ОЩ450 нм (nm) CAL1 + 0.100	1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції контролю не сталося жодної помилки (наприклад: додали неправильний калібратор); 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення калібратора.
<b>CAL 6</b> <b>100 arbU/мл</b>  <1.000 ОЩ450 нм (nm)	1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції контролю не сталося жодної помилки (наприклад: додали неправильний калібратор); 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення позитивного контролю.

Якщо виникла одна з цих проблем, після перевірки повідомте керівника для подальших дій.

**\*\*Примітка:**

Якщо використовується Контрольна сироватка, перевірте наступні дані:

Перевірка	Вимоги
Контрольна сироватка	Середня ОЩ450 нм (nm) CAL4 ±20%

Якщо результати не відповідають зазначеним вище вимогам, виконайте наступне:

Проблема	Перевірка
<b>Контрольна сироватка</b>  Відрізняється від очікуваного значення	1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції контролю не сталося жодної помилки (наприклад: додали неправильний калібратор); 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення контрольної сироватки.

У будь-якому випадку, якщо всі інші параметри (Бланк, CAL1, CAL2, CAL 6) відповідають встановленим вимогам, тест можна вважати дійсним.

**Важлива примітка:**

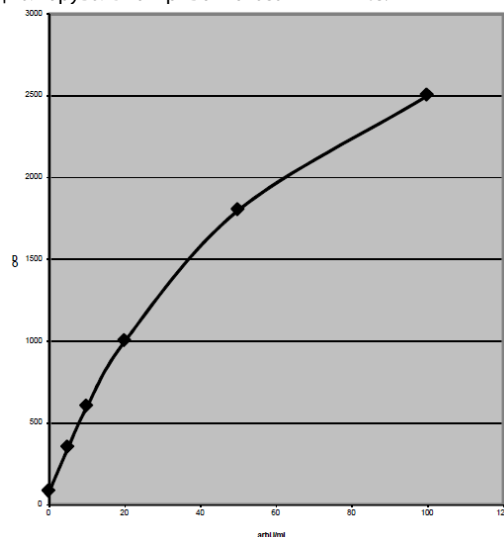
Аналіз необхідно виконати, як крок зчитування, описаний у розділі М, пункт 11.

**Р. РЕЗУЛЬТАТИ**

**Р1. Кількісний метод**

Якщо тест виявиться дійсним, використовуйте для кількісного методу затверджену програму підгонки кривої, щоб накреслити калібрувальну криву зі значень, отриманих при зчитуванні при 450 нм (nm) /620-630 нм (nm) (пропонується інтерполяція з 4 параметрами). Потім за калібрувальною кривою розраховують концентрацію антитіла IgG до VCA у зразках.

Приклад калібрувальної кривої показаний нижче:



**Важлива примітка:**

Не використовувати показану вище криву для обчислень.

**Р2. Якісний метод**

У якісному методі розрахуйте середні значення ОЩ450 нм (nm) /620-630 нм (nm) для калібраторів 0 і 5 arbU/мл, а потім перевірте чи аналіз дійсний.

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

**Примітка:** Наступні дані не можна використовувати замість реальних цифр, отриманих користувачем.

Калібратор 0 arbU/мл: 0.020 – 0.024 ОЩ450 нм (nm)  
Середнє значення: 0.022 ОЩ450 нм  
Нижче, ніж 0.150 – Прийнято

Калібратор 5 arbU/мл: 0.250 – 0.270 ОЩ450 нм (nm)  
Середнє значення: 0.260 ОЩ450 нм (nm)  
Вище, ніж Cal 0 + 0.100 – Прийнято

Калібратор 100 arbU/мл: 2.045 ОЩ450 нм (nm)  
Вище, ніж 1.000 – Прийнято

ОЩ450 нм (nm)/620-630 нм (nm) Калібратор 5 arbU/мл вважається граничним значенням cut-off (або Co) системи.  
Співвідношення між значенням ОЩ450 нм (nm) /620-630 нм (nm) зразка та ОЩ450 нм (nm) /620-630 нм (nm) Калібратор 5 arbU/мл (або S/Co) може забезпечити напівкількісну оцінку вмісту специфічного IgG у зразку.

**Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ**

Зразки з концентрацією нижче 5 arbU/мл вважаються негативними на антитіла IgG до VCA.  
Зразки з концентрацією вище 5 arbU/мл вважаються позитивними на антитіла IgG до VCA.  
У будь-якому випадку, одних лише результатів VCA IgG недостатньо для встановлення чіткого діагнозу інфекції EBV. Принаймні результати EBV VCA IgM, можливо, разом з EBNA IgG, необхідні в комбінації. Референсний

діапазон мінімальних необхідних серологічних маркерів інфекції Епштейн-Барр, отриманий з довідника інфекційних захворювань, 3-го видання, опублікованого Lexi-Comp Inc., США, схематично подано нижче:

VCA IgM	EBNA (або VCA) IgG	Інтерпретація
негативний	негативний	Відсутність в анамнезі інфекції EBV
<b>ПОЗИТИВНИЙ</b>	негативний	Гостра первинна інфекція
негативний	<b>ПОЗИТИВНИЙ</b>	Історія попередньої інфекції
<b>ПОЗИТИВНИЙ</b>	<b>ПОЗИТИВНИЙ</b>	Повторна активація

#### Важливі примітки:

1. Інтерпретація результатів повинна проводитися під наглядом керівника лабораторії, щоб зменшити ризик невірних інтерпретацій та помилок у судженнях.
2. Коли результати тестувань передаються з лабораторії в іншу установу, необхідно звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
3. Діагноз повинен поставити і передати пацієнту лікар з відповідною кваліфікацією.

#### Р. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка ефективності була проведена у зовнішньому клінічному центрі на негативних та позитивних зразках з посиланням на комерційний набір, схвалений FDA.

##### 1. Межа виявлення

Європейське співтовариство досі не визначило жодного міжнародного стандарту для виявлення антитіл VCA IgG. 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:

Мікропланшети покриті афінно очищеним нативним антигеном VCA, здатним забезпечити аналіз з найвищою специфічністю та чутливістю. Діагностичні результати були оцінені в дослідженні оцінки ефективності, проведеному у зовнішньому центрі, з чудовим досвідом діагностики інфекційних захворювань.

Діагностична чутливість була досліджена на більш ніж 50 зразках, попередньо позитивних тестах за допомогою іншого референсного набору європейського походження, який використовувався в лабораторії. Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів, які перенесли інфекцію мононуклеозу.

Діагностичну специфічність визначали на панелях із понад 50 негативних зразків від нормальних людей і донорів крові, класифікованих як негативні за допомогою референсного набору, включаючи зразки, що потенційно інтерферують.

Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, EDTA та гепарин), так і сироватку. Жодної помилкової реактивності через метод приготування зразка не спостерігалось. Заморожені зразки також були протестовані, щоб перевірити, чи заморожування зразків перешкоджає виконанню тесту. На чистих зразках і зразках без частинок ніяких перешкод не спостерігалось.

Оцінка ефективності надала такі значення:

Чутливість	≥ 98%
Специфічність	≥ 98%

##### 3. Відтворюваність

Дані, отримані в результаті дослідження, проведеного на трьох зразках різної реактивності IgG VCA, досліджених у 16 повторях у трьох окремих запусках, показують значення КВ% у діапазоні 3-16% залежно від показань ОЩ450 нм (nm)/620-630 нм (nm). Змінність, показана в таблицях, не призвела до неправильної класифікації зразка.

#### 5. ОБМЕЖЕННЯ

Помилково позитивний результат оцінювався як менше, ніж 2-5% від нормальної популяції залежно від використовуваного референсного набору. Заморожені зразки, що містять частинки або агрегати фібрину, можуть давати хибнопозитивні результати.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Engvall E. and Perlmann P. J.Immunochemistry 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.Josè, 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 ISO 13485. Кожна партія проходить контроль 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 s.r.l.  
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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

