НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgM ДО КАПСИДНОГО АНТИГЕНУ ЕПШТЕЙН-БАРР ВІРУСУ

VCA IgM

Кат. №: ***VCAM.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 співпадати.

«Захоплення» Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного/якісного визначення антитіл класу IgM до капсидного антигену вірусу Епштейн-Барр в сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

A. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного/якісного визначення антитіл класу IgM до капсидного антигену вірусу Епштейн-Барр у плазмі та сироватці людини із системою «захоплення».
Набір призначений для класифікації збудника вірусної інфекції та спостереження за пацієнтами, інфікованими EBV.
Тільки для діагностики in vitro.

B. ВСТУП

Вірус Епштейн-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, 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.

C. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Аналіз заснований на методі «IgM захоплення» та на афінно очищеному нативному антигені VCA.
Мікропланшети покриті поліклональним анти-hIgM-антитілом, яке під час 1-ї інкубації «захоплює» саме цей клас антитіл.
Після вимивання всіх інших компонентів зразка у 2-й інкубації зв'язані анти EBV-VCA IgM виявляються шляхом додавання комплексу, утвореного біотинільованим афінно очищеним нативним антигеном VCA і стрептавідином, міченим пероксидазою (HRP).
Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрату та хромогену, генерує оптичний сигнал, який пропорційний кількості антитіл IgM, присутніх у зразку, і може бути виявлений за допомогою зчитувача ELISA.
Кількісне визначення IgM стало можливим за допомогою стандартної кривої, відкаліброваної в довільних одиницях, за відсутності міжнародного стандарту, на який можна було б посилатися.

D. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

1. **Мікропланшет** *MICROPLATE*
   12 смужок x 8 мікролунок, покриті афінно-очищеними поліклональними антитілами кози, специфічними до IgM людини (u-ланцюг), і запечатані в пакет з осушувачем. Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітися 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 = 10 arbU/мл
   2 мл (ml) CAL3 =20 arbU/мл
   2 мл (ml) CAL4 = 50 arbU/мл
   4 мл (ml) CAL 5 = 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. Ліофілізований. Містить білки сироватки великої рогатої худоби, антитіла IgM людини до EBA VCA при 20 arbU/мл+20%, 0.2 мг/мл (mg/ml) сульфату гентаміцину та 0.045% ProClin 300 як консерванти.
   Важлива примітка: Обсяг, необхідний для розчинення вмісту флакону, може відрізнятися від партії до партії. Будь ласка, використовуйте правильний обсяг, зазначений на етикетці.

4. **Концентрат буферу для промивання:** *WASHBUF 20X*
   1x60 мл/пляшку (ml/bottle). 20-кратний концентрований розчин. 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 20X*
   1x0.8 мл/флакон (ml/vial). 20-кратний концентрований розчин. Містить стрептавідин, мічений пероксидазою (HRP), розчинений у буферизованому розчині 10 мМ Трис-буфера pH 6.8+/-0.1, 5% BSA, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцину сульфату як консерванти.

6. **Розчинник антигену:** *AG DIL*
   1 флакон по 16 мл. Білковий буферний розчин для приготування робочого антигену EBV VC. Розчин містить 10 мМ (mM) трис-буферу pH 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 і 0.2 мг/мл (mg/ml) гентаміцин-сульфату як консерванти. Реагент кодований 0.01% червоного харчового барвника.

7. **EBV VCA антиген:** *Ag VCA*
   1x6 флаконів. Ліофілізований реагент розчинити в 1.9 мл (ml) розчинника антигену, як зазначено у відповідному розділі. Містить біотинільований афінно очищений нативний антиген VCA, 25 мМ (mM) трис-буфер pH 7.8+/-0.1 і 5% BSA як протеїновий носій.

8. **Розчинник для зразка:** *DILSPE*
   2x60мл/флакон (ml/vial). Буферизований розчин для розведення зразків. Містить 2% казеїну, 0.2 Трис буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.2% Твін 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Компонент кодується синім кольором.

9. **Хромоген/Субстрат:** *SUBS TMB*
   1x16 мл/флакон (ml/vial). Містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатний буферний розчин з pH 3.5-3.8, 0.03% тетраметилбензидину (або ТМБ) і 0.02% перекису водню (або H_2O_2).
   Примітка: Зберігати в захищеному від світла місці, оскільки чутливий до сильного освітлення.

10. **Сірчана кислота:** *H_2SO_4 O.3 M*
    1x15 мл/пляшка (ml/vial). Містить 0.3 М розчину H_2SO_4.
    Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

11. **Ущільнювальна фольга для планшету 2 шт.**

12. **Вкладиш інструкції 1 шт.**

E. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки у діапазоні від 10 до 1000 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.

Перекладач Романюк Н. П.

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.

F. 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, 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 піддавайте 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. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не міняли місцями.
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).
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. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків; особливо азиду 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. Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові, настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
4. 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.
5. 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/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
6. Якщо присутні частинки, центрифугуйте при 2.000 об./хв. (rpm) протягом 20 хв. (min) або краще, фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8u для очищення зразка перед тестуванням.

H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

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

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:

Готова до використання. Добре перемішайте на вортексі перед використанням.

Контрольна сироватка:

Ліофілізований реагент розчинити водою класу ELISA, як зазначено на етикетці.
Примітка: *Для повного збереження його реакційної здатності після розчинення зберігайте надлишок у замороженому вигляді в аліквотах при –20°C (°C) і використовуйте лише один раз. Повторно не заморожувати.*

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням 20X концентрований розчин слід розбавити подвійно дистильованою водою до 1200 мл (ml) 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).*

Комплекс Антиген-Кон'югат:

Виконайте обережно наступне:

1. Розчиніть вміст ліофілізованого флакону з 1.9 мл (ml) розчинника антигену. Дайте ліофілізованому вмісту повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі.
2. Обережно перемішайте концентрований ферментний кон'югат на вортексі. Потім додайте 0.1 мл (ml) його у флакон з розчиненим антигеном EBV VC і обережно перемішайте на вортексі.

Важливі примітки:

1. *Розчиніть і приготуйте лише кількість флаконів, необхідну для дослідження. Отриманий комплекс не є стабільним. Зберігайте будь-який залишковий розчин у замороженому вигляді в аліквотах при –20°C (°C)*
2. *Підготовку комплексу необхідно проводити* ***безпосередньо*** *перед подачею зразків і контролів у планшет. Знову обережно перемішайте на вортексі безпосередньо перед використанням.*

Розчинник для зразків:
Готовий до використання компонент. Перед використанням добре 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 піддавайте 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 сильне подразнення очей.

Попереджувальні **P-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.

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 (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%.
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.
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 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.
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 стандартними характеристиками 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 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.
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. Переконайтесь, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком.
3. Переконайтеся, що Хромоген/Субстрат безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.
4. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролито рідини всередині коробки.
5. Переконайтесь, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
6. Розведіть увесь вміст 20-кратного концентрованого Розчину для промивання як описано вище.
7. Розчиніть Контрольну сироватку як описано вище та обережно перемішайте.
8. Приготуйте комплекс Антиген/Кон'югат як повідомлялося.
9. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (приблизно 1 год), а потім обережно перемішайте на вортексі всі рідкі реагенти.
10. 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.
11. Перевірте, що ІФА зчитувач увімкнено або переконайтеся, що він увімкнений принаймні за 20 хвилин до зчитування.
12. Якщо використовується автоматизована робоча станція, увімкніть, перевірте налаштування та переконайтеся, що ви використовуєте правильний протокол аналізу.
13. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
14. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
15. 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.
За бажанням клініциста за допомогою пристрою можна провести дві процедури.

M1. Кількісний аналіз:

1. Помістіть необхідну кількість Мікролунок у тримач. Лунку A1 та B1 залишіть порожньою для бланкування.

2. Розведіть зразки 1:101, розподіливши 1 мл (ml) Розчинника зразка в одноразову пробірку, а потім 10 мкл (µl) зразка; перемішати на вортексі перед використанням. Не розбавляйте калібратори та контрольну сироватку, оскільки вони готові до використання.
3. Приготуйте комплекс антиген-кон'югат як описано у розділі H.
4. Внесіть піпеткою 100 мкл (µl) всіх калібраторів і 100 мкл (µl) контрольної сироватки в двох примірниках; потім додайте 100 мкл (µl) зразків. Контрольна сироватка використовується для перевірки того, що вся аналітична система працює належним чином. Перевірте, чи правильно додано контрольну сироватку, калібратори та зразки. Потім інкубуйте мікропланшет **при +37°C (°C) протягом 60 хв**.

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.*

5. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як повідомлялося раніше (розділ I.3).
6. У всі лунки, крім A1 і B1, внесіть піпеткою 100 мкл (µl) комплексу антиген/кон'югат. Перевірте, чи правильно додано реагент. Інкубуйте мікропланшет **при +37°C протягом 60 хвилин.**

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

7. Помити мікропланшет як повідомлялося у пункті 1.3
8. Внесіть піпеткою по 100 мкл (µl) суміші Хромоген/Субстрат у кожну лунку, включно з бланк-лункою A1 та B1. Потім інкубуйте мікропланшет **при кімнатній температурі протягом 20 хвилин.**

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

9. Внесіть піпеткою 100 мкл (µl) Сірчаної кислоти у всі лунки, щоб зупинити ферментативну реакцію, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі. Потім за допомогою зчитувача мікропланшетів виміряйте інтенсивність кольору при 450 нм (nm) (зчитування) і при 620-630 нм (nm) (бланкування, обов'язкове), бланкуючи інструмент на A1 та B1, або на обидвох.

M2. Якісний аналіз

1. Помістіть необхідну кількість Мікролунок у тримач. Лунку A1 залишіть порожньою для бланкування. Зберігайте інші лунки у пакеті з осушувачем при 2..8°C (°C).
2. Розведіть зразки 1:101, розподіливши 1 мл (ml) Розчинника зразка в одноразову пробірку, а потім 10 мкл (µl) зразка; перемішати на вортексі перед використанням. Не розбавляйте калібратори та контрольну сироватку, оскільки вони готові до використання.
3. Приготуйте комплекс антиген-кон'югат як описано у розділі H.
4. Внесіть піпеткою 100 мкл (µl) CAL1 у двох примірниках, 100 мкл (µl) CAL2 в двох примірниках, 100 мкл (µl) CAL5 в одному примірнику. Потім додайте 100 мкл (µl) зразків. Перевірте, чи правильно додано контрольну сироватку та зразки. Потім інкубуйте мікропланшет **при +37°C (°C) протягом 60 хв**.

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.*

5. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як повідомлялося раніше (розділ I.3).
6. У всі лунки, крім A1, внесіть піпеткою 100 мкл (µl) комплексу антиген/кон'югат. Перевірте, чи правильно додано реагент. Інкубуйте мікропланшет **при +37°C протягом 60 хвилин.**

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

7. Помити мікропланшет як повідомлялося у пункті 1.3
8. Внесіть піпеткою по 100 мкл (µl) суміші Хромоген/Субстрат у кожну лунку, включно з бланк-лункою A1. Потім інкубуйте мікропланшет **при кімнатній температурі протягом 20 хвилин.**

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

9. Внесіть піпеткою 100 мкл (µl) Сірчаної кислоти у всі лунки, щоб зупинити ферментативну реакцію, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі. Потім за допомогою зчитувача мікропланшетів виміряйте інтенсивність кольору при 450 нм (nm) (зчитування) і при 620-630 нм (nm) (бланкування, обов'язкове), бланкуючи інструмент на A1.

Загальні зауваження:

1. *Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.*
2. *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)
1-а інкубація	**60 хв**
Температура	+37 °C (°C)
Етап промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (µl)
2-а інкубація	**60 хв**
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМБ/H_2O_2	100 мкл (µl)
3-я інкубація	**20 хв**
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	S3									
B	BLK	CAL4	S4									
C	CAL1	CAL5	S5									
D	CAL1	CAL5	S6									
E	CAL2	CS (*)	S7									
F	CAL2	CS (*)	S8									
G	CAL3	S1	S9									
H	CAL3	S2	S10									

Легенда: BLK = Бланк CAL= Калібратори // // S= Зразок //
CS = Контрольна сироватка – необов'язково

Нижче наведено приклад схеми розподілу для якісного аналізу:

Мікропланшет

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2	S10									
B	CAL1	S3	S11									
C	CAL1	S4	S12									
D	CAL2	S5	S13									
E	CAL2	S6	S14									
F	CAL5	S7	S15									
G	S1	S8	S16									
H	S2	S9	S17									

Легенда: BLK = Бланк // CAL= Калібратори // S= Зразок

Перекладач Романюк Н. П.

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	< 0.200 ОЩ450 нм (nm) значення після бланкування
CAL 2 10 arbU/мл	ОЩ450нм вище, ніж ОЩ450 нм (nm) CAL1 + 0.100
CAL 5 100 arbU/мл	> 1.000 ОЩ450 нм (nm)
Коефіцієнт варіації	<30% для Калібратора 1

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

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

Проблема	Перевірка
Бланк-лунка > 0.100 ОЩ450 нм (nm)	1. щоб розчин Хромогену/Субстрату не був забруднений під час аналізу
CAL 1 ОЩ450 нм (nm) >0.200 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 під час видачі калібраторів; 4. що жодного забруднення негативного калібратора 1 або його лунок не відбулося через розливи позитивних зразків або комплекс Антиген/ Кон'югат; 5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або комплексом Антиген/Кон'югат. 6. що голки вошера не заблоковані або частково не забруднені
CAL 2 ОЩ450нм < 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.
CAL 5 ОЩ450 нм (nm) <1.000	1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції контролю не сталося жодної помилки; 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення калібратора.

****Примітка:**

Якщо використовується Контрольна сироватка, перевірте наступні дані:

Перевірка	Вимоги
Контрольна сироватка	ОЩ450 нм = ОЩ450 нм (nm) CAL20 arbU/мл +/-20%

Якщо результати не відповідають зазначеним вище вимогам, виконайте наступне:

Проблема	Перевірка
Контрольна сироватка 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 контролю.

У будь-якому випадку, якщо всі інші параметри (Бланк, CAL1, CAL2, CAL 5) відповідають встановленим вимогам, тест можна вважати дійсним.

Важлива примітка:

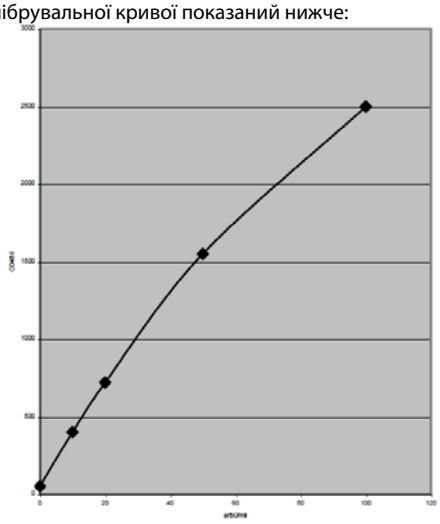
Аналіз необхідно виконати, як крок зчитування, описаний у розділі M, пункт 9.

P. РЕЗУЛЬТАТИ

P1. 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 IgM до EBV VCA у зразках.

Приклад калібрувальної кривої показаний нижче:



Примітка:

Не використовувати ці дані для обчислення реальних результатів аналізу. Вищевказані цифри наведені тільки для прикладу.

P2. Якісний метод

Перевірте чи дійсний аналіз.

Приклад наведений нижче:

Нижче наведено приклад розрахунку (дані, отримані як етап зчитування, описаний у розділі M, пункт 9):

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 0.200 – Прийнято

Калібратор 10 arbU/мл: 0.250 – 0.270 ОЩ450 нм (nm)
Середнє значення: 0.260 ОЩ450 нм (nm)
Вище, ніж Cal 1 + 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 10 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) Калібратора 10 arbU/мл (або S/Co) може забезпечити напівкількісну оцінку вмісту специфічного IgM у зразку.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ
Зразки з концентрацією нижче 10 arbU/мл вважаються негативними на антитіла IgM до EBV VCA.
Зразки з концентрацією вище 10 arbU/мл вважаються позитивними на антитіла IgM до EBV VCA.
У будь-якому випадку, одних лише результатів VCA IgM недостатньо для встановлення чіткого діагнозу інфекції EBV. Принаймні результати 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
позитивний	негативний	Гостра первинна інфекція
негативний	**позитивний**	Історія попередньої інфекції
позитивний	**позитивний**	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.*

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
Оцінка ефективності була проведена у зовнішньому клінічному центрі на негативних та позитивних зразках з посиланням на комерційний набір.

1. Межа виявлення
Європейське співтовариство досі не визначило жодного міжнародного стандарту для виявлення антитіл EBV VCA 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:
Аналіз заснований на методі «IgM захоплення» та на афінно очищеному нативному антигені VCA для забезпечення найвищої специфічності та чутливості.
Діагностичну чутливість досліджували на більш ніж 50 зразках, попередньо позитивних тестах за допомогою референсного набору європейського походження, що використовується в лабораторії. Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів, які перенесли гострий мононуклеоз.
Діагностична специфічність була визначена на панелях із понад 250 негативних зразків від нормальних осіб і донорів крові, класифікованих як негативні за допомогою референсного набору, включаючи зразки, які можуть інтерферувати.
Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватку. Немає помилкової реактивності через метод приготування зразка.
Заморожені зразки також були протестовані, щоб перевірити, чи заморожування зразків перешкоджає виконанню тесту. На чистих зразках і зразках без частинок ніяких перешкод не спостерігалося. Оцінка ефективності надала такі значення:

Чутливість	> 98%
Специфічність	> 98%

3. Відтворюваність
Дані, отримані в результаті дослідження, проведеного на трьох зразках різної реактивності IgM VCA, досліджених у 16 повторах у трьох окремих запусках, показують значення КВ% у діапазоні 2-8% залежно від зчитувань ОЩ450 нм (nm)/620-630 нм (nm).
Змінюваність, показана в таблицях, не призвела до неправильної класифікації зразка.

S. ОБМЕЖЕННЯ
Помилкова позитивність оцінюється як менше, ніж 2% від нормальної популяції, в основному через високі титри ревматоїдного фактору. Системи захоплення IgM, навіть якщо вони визнані більш специфічними, ніж аналізи типу «сендвіч», насправді можуть піддаватися впливу такого роду речовин, що інтерферують.
Заморожені зразки, що містять частинки або агрегати фібрину, можуть давати хибно позитивні результати.

T. ТЕСТ-ПІДТВЕРДЖЕННЯ
Щоб забезпечити лікаря з найкращою точністю при тестуванні на інфекцію EBV, повідомляється про підтверджувальний аналіз. Тест на підтвердження має бути проведений на будь-якому позитивному зразку, перш ніж діагноз первинної інфекції EBV буде передано лікарю.

Для підтвердження виконайте наступне:

1. Приготуйте комплекс антиген/кон'югат, як описано у відповідному розділі.
2. Лунку A1 смужки залишають порожньою для бланкування.
3. CAL 2 (10 arbU/мл) дозується в смужку в положеннях B1+C1.
4. Позитивний зразок, що підлягає підтвердженню, розведений 1:101, видається в смужку в положенні D1+E1.
5. Смужку інкубують протягом 60 хв при +37°C (°C).
6. Після вимивання, бланк-лунка A1 залишається порожньою.
7. 100 мкл (µl) комплексу Антиген/Кон'югат додають лунки B1+C1+D1.
8. Потім до лунки E1 додають 100 мкл (µl) лише ферментного кон'югату (CONJ). ***Примітка:*** *цей матеріал не містить антигену VCA, лише кон'югат*
9. Смужку інкубують протягом 60 хв при +37°C (°C).
10. Після промивання в усі лунки додають 100 мкл (µl) хромогену/субстрату і смужку інкубують протягом 20 хв при кімнатній температурі.
11. У всі лунки додають по 100 мкл (µl) Сірчаної кислоти, а потім вимірюють їх інтенсивність кольору при 450 нм (фільтр для зчитування) і 620-630 нм (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи інструмент на A1.

Інтерпретація результатів здійснюється наступним чином:
1. Якщо зразок у положенні D1 показує ОЩ450 нм (nm) /620-630 нм (nm) нижче, ніж у CAL 2, ймовірно під час першого тесту допустили помилку під час розподілу або відбулося забруднення. Процедуру аналізу в розділі M необхідно повторити, щоб перевірити аналіз.
2. Якщо зразок у позиції D1 показує значення ОЩ450 нм (nm)/620-630 мн (nm) вище, ніж значення CAL 2, а в положенні E1 показує значення ОЩ450 нм (nm)/620-630 нм (nm) все ще вище, ніж значення CAL 2, зразок вважається **хибнопозитивним**. Реакційна здатність зразка фактично не залежить від специфічної присутності антигенів EBV VCA, тому відбулася перехресна реакція з ферментним кон'югатом.
3. Якщо зразок у положенні D1 показує значення ОЩ450 нм (nm)/620-630 нм (nm) вище, ніж значення CAL 2, а в положенні E1 показує значення ОЩ450 нм (nm) /620-630 нм (nm) нижче, ніж значення CAL 2, зразок вважається **дійсно позитивним**. Реакційна здатність зразка фактично залежить від специфічної присутності антигенів EBV VCA, а не від перехресної реакції лише з кон'югатом.

Інтерпретація результатів показана у наступній таблиці:

Лунка	ОЩ450 нм (nm)/ 620-630 нм (nm)		
D1	<CAL 2	> CAL 2	> CAL 2
E1	< CAL 2	> CAL 2	< CAL 2
Інтерпретація	**Проблема забруднення**	**Помилково позитивний**	**Дійсно позитивний**

ЛІТЕРАТУРА

1. Evans AS and Niederman JC, Am J Clin Pathol, 1982, 77(5): 555-60
2. Fleisher GR, Collins M and Fager S, J Clin Microbiol, 1983, 17(4): 619-24
3. Howitz CA, Henle G et al., Am J Med, 1977, 63(6): 947-57.
4. Straus SE, Cohen JL, Tosato G et al., Ann Intern Med, 1993, 118(1): 45-58
5. Engvall E. and Perlmann P.. J. Immunochemistry, 8, 871- 874, 1971
6. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol. 109, 129-135, 1971

Перекладач Романюк Н. П.

7. Volk W.A.. In “Essential of Medical Microbiology”. 2nd ed. pp 729, G.B.Lippincott Company, Philadelphia, New York, S.Josè, Toronto.
8. Betts R.F. and al.. Journal of Infectious Diseases, 143:821- 826, 1981.
9. Engelhard D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 163.628- 630, 1991.
10. Griffiths P.D. et al.. Journal of Infectious Diseases. 145. 647-653, 1982
11. Kraat Y.J. et al.. Journal of Clin.Microbiol.. 30: 522-524, 1992.
12. Landini M.P. et al.. Eur.J.Clin.Microbiol.. 8: 159-163, 1989

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
www.diameb.ua

Перекладач Романюк Н. П.