

EBV VCA-IgM-ELA Test PKS medac

Русский

δ

0123

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

medac

Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Fehlandtstraße 3
D-20354 Hamburg

ОТДЕЛ МАРКЕТИНГА

medac

Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Geschäftseinheit Diagnostika
Theaterstrasse 6
D-22880 Wedel

Phone: ++49/ 4103 / 8006 - 347
Fax: ++49/ 4103 / 8006 - 359

АДРЕС

Phone: ++49/ 4103 / 8006 - 111
Fax: ++49/ 4103 / 8006 - 113

EBV VCA-IgM-ELA Test PKS medac

Иммуноферментный анализ с Системой Контроля Раскапывания для количественного определения IgM антител к вирусу Эбштейн Барра – специфической оболочке антигена в сыворотке

Кат. № : 127-PKS

Только для диагностики in vitro.

ВВЕДЕНИЕ

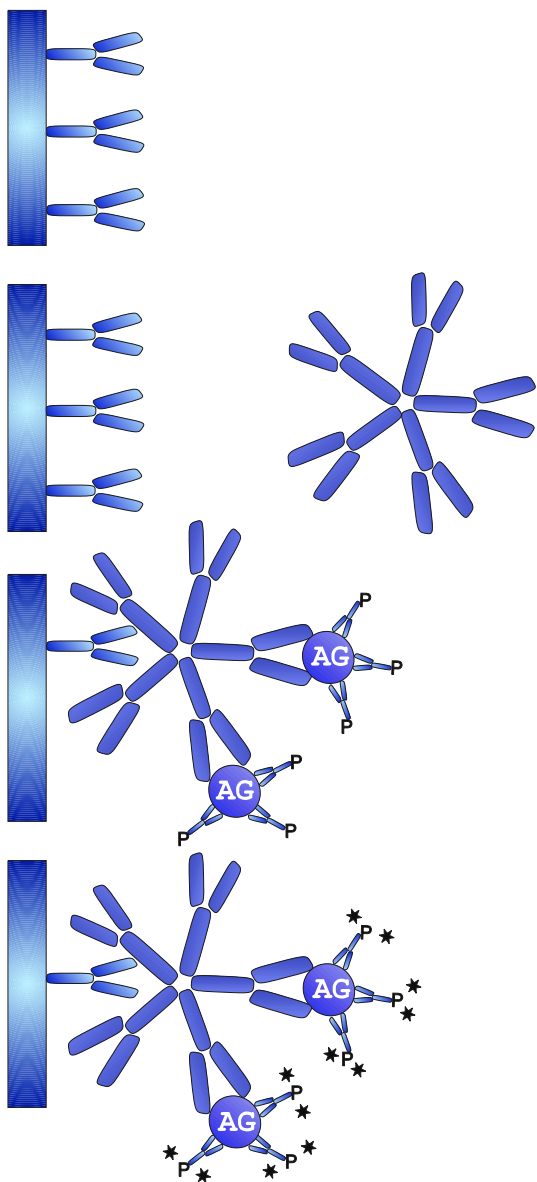
Вирус Эпштейна Барра относится к группе вирусов герпеса. Он состоит из двуспиральной ДНК генома, оболочки, наружного покрова и оболочки. Характерно для этого вируса – это оставаться латентным и жить долго в организме после первичной инфекции.

90% – 95% взрослых людей заражены вирусом Эбштейна Барра по всему миру. Течение первичной EBV инфекции, у иммунокомпетентных пациентов происходит в раннем детстве без каких либо симптомов. В раннем детстве проявляется без всяких симптомов. В подростковом возрасте инфекция обнаруживается как мононуклеоз (лимфоидно-клеточная ангина). Личности, страдающие иммунодепрессией, клинически привязаны к реактивации вируса. У людей, страдающих подавлением иммунитета наблюдаются поликлональные В-клеточные лимфомы. В 60% из всех хронических лимфом Ходкина, EBV ДНК присутствует. Эндемично релевантный ВЭБ-ассоциируемые новообразования являются лимфомами Баркитта и носоглоточными карциномами.

Антигенные комплексы для выявления антител – это ВЭБ-специфические ядерный антиген (EBNA), вирусная оболочка антигена (VCA) и ранний антиген (EA). Определение антител у иммунокомпетентных пациентов для распознавания первичной инфекции по отношению к прошедшей инфекции или серонегативности – это акцент в диагностике вируса Эбштейна Барра. ВЭБ серология несет важное значение в диагностике лимфаденопатии и неясных неврологических заболеваний. В среде с характерной серологией вируса Эбштейна Барра, определение EBNA-1 IgG является первым этапом. Положительный результат подтверждает прошедшую инфекцию. В случае отрицательного EBNA-1 результата, определение VCA IgG и IgM необходимо для дифференциации статуса инфекции.

The EBV VCA-IgM-ELA Test PKS medac определяет IgM антитела к вирусной оболочке протеина gp 125. Тест может быть поставлен легко и просто. М-захват и ELA принцип позволяет добиться высокой специфичности и чувствительности.

Принцип теста



СОДЕРЖИМОЕ УПАКОВКИ

Кат №: 127-РКС

1.

МТР

Микропланшета: 12 стрипов по 8 лунок (с рамкой и влагопоглощающей прокладкой), ломающиеся стрипы, U-образной формы, покрыты козими анти-человеческим IgM иммуноглобулином, бычий сывороточный альбумин и рН индикатор, готов к использованию.
2.

КОНТРОЛЬ	-
-----------------	----------

Отрицательный контроль: 1 флакон - 1,5 мл, человеческая сыворотка, готов к использованию, содержит бычий сывороточный альбумин, фенол, Проклин 300 и гентамицина сульфат.
3.

КОНТРОЛЬ	+
-----------------	----------

Положительный контроль: 1 флакон - 1,5 мл, человеческая сыворотка, готов к использованию, содержит бычий сывороточный альбумин, фенол, Проклин 300 и гентамицина сульфат.
4.

МОЩЬ БУФЕР

Концентрат моющего буфера: 1 флакон 100 мл, PBS/Твин(10X), рН 7.2-7.4, содержит Проклин 300.
5.

БУФЕР ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ ПРОБ

Буфер для разведения проб: 1 флакон 110 мл, рН 7.2- 7.4, готов к использованию, окрашен в зеленый цвет, содержит бычий сывороточный альбумин, фенол, Проклин 300 и гентамицина сульфат.
6.

ANTIGEN-DIL

Антиген разбавитель: 1 флакон 14 мл, ацетат натрия/уксусная кислота, готов к использованию, содержит Проклин 300.
7.

ANTIGEN

Антиген: 6 флаконов по 2.0 мл каждый, EBV VCA gp 125 antigen/BSA/FCS, lyophilised.
8.

КОНЬЮГАТ

Конъюгат: 1 флакона - 0,35 мл, анти-VCA gp 125 IgG антитела, моноклональные (мышинные), конъюгированный HRP, готов к использованию, окрашенный в красный цвет, содержит бычий сывороточный альбумин, фенол, Проклин 300 и гентамицина сульфат.
9.

ТМВ - СУБСТРАТ

ТМВ-субстрат: 1 флакон 10 мл, готов к использованию.

10. **СТОП - РАСТВОР**

Стоп - раствор: 2 флакона по 11 мл каждый, 0,5 м серной кислоты (H₂SO₄), готов к использованию.

1. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ

Материал/реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Тест - упаковка	не открытая	2...8 °С	до истечения срока годности
Микропланшета	открытая	2...8 °С закрытые в алюминиевый пакет с осушителем- влагопоглотителем	6 weeks
Контроли	открытые	2...8 °С	6 недель
Моющий буфер	разведенный	2...8 °С	6 недель
Буфер для разведения проб	открытый	2...8 °С	6 недель
Антиген разбавитель	открытый	2...8 °С	6 недель
Конъюгат	открытый	2...8 °С	6 недель
Антиген-конъюгат смесь	Готов к использованию	RT	6 часов
ТМВ-субстрат	открытый	2...8 °С	6 недель
Стоп - раствор	открытый	2...8 °С	до истечения срока годности

Не использовать реагенты после истечения срока годности.

2. ДОПОЛНИТЕЛЬНО НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

2.1. Вода для инъекций. Использование дионизируемой воду может нарушить процедуру теста.

2.2. Микропипетки с изменяемым объемом

2.3. Чистый стеклянный или пластиковый сосуд для приготовления моющего буфера и образцов

2.4. Необходимое оборудование для промывки микропланшет (мультистеппер или микропланшетный вошер)

2.5. 37 °C – инкубатор

2.6. Микроплащечный ридер (фотометр) с фильтрами 450 нм и 620 – 650 нм

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ

До начала процедуры все компоненты набора были доведены до комнатной температуры. Рассчитать необходимое количество стрипов.

3.1. Микропланшета

После каждого взятия стрипов алюминиевый пакет должен плотно закрываться вместе с влагопоглощающей прокладкой. Срок годности и условиях хранения указаны в п.1.

Примечание: лунки микропланшета окрашены в зеленый цвет. Возможно появление зеленовато коричневых пятен внутри лунок в процессе процедуры теста и не влияют на результаты теста.

3.2. Мощий буфер

Смешать одну часть концентрата мощего буфера (10x) с девятью частями бидистиллированной воды (например, 50 мл. концентрата мощего буфера (10x) – с 450 мл. бидистиллированной воды). На каждый стрип необходимо 10 мл разведенного мощего буфера.

Кристаллы концентрата мощего буфера (10x) растворяются при нагревании (макс. 37 °C).

3.3. Антиген-конъюгат смесь

Смешать лиофильный антиген с 2.0 мл антигена разбавителя. Мягко смешать и следить за тем, что бы частицы растворились. Добавить 50 мл конъюгата к 2.0 мл антигена за час до использования.

После смешивания антигена и добавления конъюгата, антиген-конъюгат смесь окрасится в красный цвет и готова к использованию.

Готовый к использованию антиген-конъюгат может быть использован при комнатной температуре в течении 6 часов (см. 1.).

Не смешивать реагенты одной партии (микропланшета, контроли, конъюгат, калибратор) с реагентами других партий или других производителей. Напротив, мощий буфер, ТМВ-субстрат и стоп раствор, могут быть заменены во всех вирусологических наборах medac.

Реагенты других производителей не должны быть использованы.

Точные и воспроизводимые результаты получаются, если процедура теста выполняется точно.

4. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

- 4.1. Вид исследуемого материала: сыворотка.
- 4.2. Сыворотки не требуют специальной инактивации. Однако они не должны быть контаминированы микроорганизмами или содержать эритроциты.
- 4.3. Сыворотки должны быть разведены 1:100 буфером для разведения проб. Они могут быть разведены позже для определения титра.

5.А. ПРЕДПИСАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ТЕСТА

- 5.1. Упаковку планшета вскрыть по линии вскрытия и взять необходимое количество стрипов (см. 3.1.).

Микроланшет готов к использованию и не требует предварительной отмывки.

- 5.2. Оставить лунку A1 пустой в качестве бланка (см. 6.А.). В соответствующие лунки планшета добавить по 50 мкл Отрицательного контроля, Положительного контроля и разведенной сыворотки пациентов и 50 мкл калибратора в дубле.

После раскапывания образцы в лунках окрасятся в сине-зеленый цвет. Отсутствие смены цвета говорит о том, что в лунки не был добавлен образец или контроль.

При необходимости, микропланшеты могут храниться во влажной камере в течении 30 минут до комнатной температуры перед постановкой теста.

- 5.3. Стрипы инкубировать в течение 60 мин (± 5 мин) при температуре 37 °C (± 1 °C) во влажной камере или заклеенными инкубационной оберточной фольгой.
- 5.4. Приготовить антиген-конъюгат смесь (см. 3.3.).
- 5.5. После инкубации промыть стрипы три раза 200 мкл мощего буфера на каждую лунку. Следить за тем, чтобы все лунки при промывке были заполнены. После окончания процесса отмывки вытряхнуть стрипы на фильтровальную бумагу.

Не позволяйте лункам высохнуть! Незамедлительно использовать!

5.6. Добавить антиген-конъюгат смесь (красного цвета) в каждую лунку (исключая A1).

Пожалуйста помните:

при работе на автоматическом приборе (имеется в виду полный автомат) из-за большого испарения в инкубаторе прибора каждую лунку должно быть пипетировано по 60 мкл.

Условия использования тестов на автоматических анализаторах были подтверждены эмпирическим путем. Кроме того мы предлагаем проверять совместимость тестов с используемым оборудованием.

5.7. Инкубировать в течение 60 мин. (± 5 мин) при температуре 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) во влажной камере или заклеенными в инкубационную оберточную фольгу.

5.8. После инкубации промыть стрипы еще раз (см. 5.5.).

5.9. Добавить во все лунки 50 мкл. ТМВ-субстрата и инкубировать в течение 30 минут (± 2 мин) при температуре 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) во влажной камере или заклеенными в инкубационную фольгу в темноте. Положительные пробы приобретут голубой цвет.

5.9. Добавить 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку для остановки реакции. У положительных сывороток происходит смена окраски с голубого на желтый.

5.9. Добавить 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку для остановки реакции. У положительных сывороток происходит смена окраски с голубого на желтый.

Перед фотометрическим считыванием очистите наружную поверхность дна лунок и проследите, чтобы в лунках отсутствовали воздушные пузырьки.

Считывание необходимо производить в течение 15 минут после добавления стоп-раствора!

5 Б. ТАБЛИЦА РАБОЧЕЙ ПРОЦЕДУРЫ

	Бланк (A1)	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Образец
--	------------	------------------------	------------------------	---------

Отрицательный контроль	-	50 µl	-	-
Положительный контроль	-	-	50	-
Образец	-	-	-	50 µl
Инкубировать 60 мин. при 37° С, промыть 3 раза по 200 мкл промывающим буфером.				
Антиген-конъюгат смесь	-	50/60 µl*)	50/60 µl*)	50/60 µl*)
Инкубировать 60 мин. при 37° С, промыть 3 раза по 200 мкл промывающим буфером.				
ТМВ-субстрат	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Инкубировать 30 минут при 37 °С в темноте				
Стоп - раствор	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Фотометрическое считывание при 450 нм (референс 620 - 650 нм)				

* ручная/автоматическая процедура (см.п.5.6.)

6.А. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ (ВАЛИДНОСТЬ)

- * Считывание значений Оптической Плотности (ОП) производится при длине волны 450 нм (референс 620 - 650 нм).
- * Вычтите значение ОП бланка (лунка А1) из всех других значений ОП.
- * Номинальное значение **отрицательного контроля** < 0,150
Номинальное значение **положительного контроля** > 0,800
- * **Cut-off = номинальное значение ОП отрицательного + 0.140**

Тест необходимо повторить, если результаты не совпадают со спецификацией.

6.Б. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ/ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- * Пробы, значения ОП которых лежат ниже нижней границы серой зоны, оцениваются как **отрицательные**.
- * Пробы, значения ОП которых лежат в пределах серой зоны, оцениваются как **неопределенные**. Они должны быть повторно протестированы параллельно со свежими образцами, взятыми 14 дней спустя для того чтобы определить изменение титра.

- * Пробы, значения ОП которых лежат выше верхней границы серой зоны, оцениваются как **положительные**.
- * Результаты всегда должны быть интерпретированы в соответствии с клиническими показаниями пациентов, а так же с VCA IgG, the VCA.
- * Перекрестные реакции, обусловленные антитела к другим герпес вирусам не могут быть исключены в отдельных случаях.
- * Высокое содержание гемоглобина, билирубина и липидов в сыворотке не влияет на результаты.

6.В. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ВЭБ СЕРОЛОГИИ С ТЕСТАМИ MEDAC

Следующие интерпретации результатов теста относительно статуса инфекции действительны только для исследования иммунокомпетентный пациентов.

EBNA-1-IgG	VCA-IgG	VCA-IgM	Interpretation
-	-	-	серонегативный
+	+ / ± / -	-	Прошедшая инфекция
-	+ / ± / -	+	Текущая

Во всех отношениях констелляция может быть интерпретирована как неясная. В случае неясного результата, расширенная дифференциальная диагностика имеет важное значение для интерпретации.

В порядке исключения количества неясных результатов мы рекомендуем использовать всю EBV ELISA панель.

7. ХАРАКТЕРИСТИКИ

Следующие характеристики были определены в процессе диагностических исследований.

7.А. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ

165 сывороток были исследованы в процессе диагностически. Результаты колерированы с диагностическими характеристиками в лаборатории профессора доктора Эндерса и его коллег в Штутгарте. Результаты представлены в следующей таблице:

Результаты			
	отрицательный	Cut-off	положительный

EBV VCA-IgM- ELA Test PKS medac	отрицательный	237	0	11
	cut-off	1	0	1
	положительный	1	0	101

Чувствительность = 89.4 %

Специфичность = 99.2 %

Согласованность: 96 %

7.В. ТОЧНОСТЬ

образец	Колебания внутри теста				Sample	Колебания вне теста			
	номинальное AU	SD	CV (%)			номинальное AU	SD	CV (%)	
NC	0.069	0.012	17	23	NC	0.070	0.010	14	12
BC	0.456	0.013	3	23	BC	0.441	0.019	4	12
PC	1.361	0.030	2	23	PC	1.282	0.057	4	12
N°1	0.050	0.005	10	23	N°4	0.076	0.010	13	12
N°2	0.839	0.029	3	23	N°5	0.392	0.037	9	12
N°3	1.981	0.033	2	23	N°6	0.769	0.046	6	12
					N°7	1.160	0.051	4	12
					N°8	1.884	0.064	3	12

NC = отрицательный контроль; BC = слабый положительный контроль (не включен в набор);

PC = положительный контроль

ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- * Не путать флаконы с реактивами и их крышки во избежание перекрестного загрязнения.
- * Флаконы с реактивами после использования необходимо сразу же плотно закрыть, во избежание испарения и микробного заражения.
- * После использования все компоненты тест-набора, должны быть помещены в оригинальную упаковку, во избежание путаницы с реагентами других тест-наборов или лотов.

УКАЗАНИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

- * Следует придерживаться предписаниям по технике безопасности для лабораторий.
- * Реактивы, произведенные из человеческих биоматериалов, были проверены на HBsAg, HCV, HIV 1 и -2 антитела и классифицированы как неинфицированные. Однако рекомендуется обращаться с данным материалом как потенциально инфицированным, полученными из биологических образцов животных, соблюдая необходимые меры предосторожности.

ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ

Остатки химических препаратов в целом рассматриваются как опасные отходы. Обезвреживание и удаление отходов этого характера производится в соответствии с национальными и региональными инструкциями. Свяжитесь с местными специалистами или учреждениями по вопросам обезвреживания и удаления опасных отходов, где вы смогли бы получить соответствующие рекомендации.

ОБЗОР

Bauer, G.: Epstein-Barr-Virus - Bedeutung und Möglichkeiten der Labordiagnostik. Therapeutische Umschau 51(8), 558-562 (1994).

Bauer, G.: The rational basis for efficient Epstein-Barr Virus (EBV) serology. Clin. Lab. 41(9), 623-634 (1995).

Hille, A., Klein, K., Baumler, S., Grasser, F.A., Mueller-Lantsch, N.: Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1, 2A and 2B in the baculovirus expression system: serological evaluation of human antibodies to these proteins. J. Med. Virol. 39 (3), 233-241 (1993).

Linde, A.: Diagnosis of Epstein-Barr Virus - related diseases. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 100, 83-88 (1996).

Mertens, T., Haller, O., Klenk, H.-D. (Hrsg.): Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten. 65-70, Urban & Fischer Verlag (2004).

Modrow, S., Falke, D. (Hrsg.): Molekulare Virologie. 454-460, Spektrum Akademischer Verlag (1997).

Prang, N.S., Schwarzmann, F.: Aktuelle Perspektiven in der Diagnostik Epstein-Barr-Virus assoziierter Erkrankungen. Immun. Infekt. 4, 144-151 (1997).

