

**EBV EBNA-1-IgG-ELISA 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 EBNA-1-IgG-ELISA**

Иммуноферментный анализ с Системой Контроля Раскапывания для количественного определения IgG антител к вирусу Эбштейн Барра – специфическому ядерному антигену-1 (EBNA-1) в сыворотке

Кат. № : 126/ТМВ

Только для диагностики *in vitro*.

### **ВВЕДЕНИЕ**

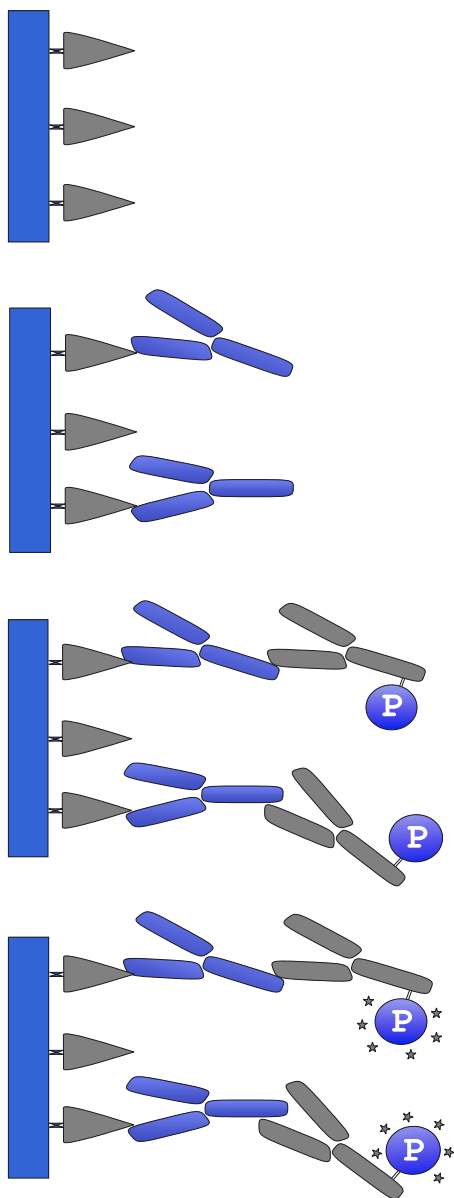
Вирус Эпштейна Барра (ВЭБ) относится к группе вирусов герпеса. Он состоит из двухспиральной ДНК генома, ядра, внешнего покрова и оболочки. Для этого вируса характерно оставаться латентным и долго жить в организме после первичной инфекции.

90% – 95% взрослых людей заражены вирусом Эбштейна Барра по всему миру. Первичная ВЭБ инфекция, у иммунокомпетентных пациентов протекает в раннем детстве без каких либо симптомов. В подростковом возрасте инфекция проявляется как мононуклеоз (лимфоидно-клеточная ангина). У лиц с небольшой иммуносупрессией инфекция клинически может протекать в виде латентной реактивации вируса. У лиц с ярковыраженной иммуносупрессией наблюдается связь ВЭБ с поликлональной В-клеточной лимфомой. ДНК ВЭБ присутствует в 60 % случаях всех лимфом Ходкинса. Лимфомы Баркита и носоглоточные карциномы являются эндемично связанными с ВЭБ ассоциированными опухолевыми заболеваниями.

Антигенные комплексы для выявления антител – это ВЭБ-специфический ядерный антиген (EBNA), антиген вирусной оболочки (VCA) и ранний антиген (EA). Определение антител у иммунокомпетентных пациентов для распознавания первичной инфекции по отношению к прошедшей инфекции или серонегативности – это фокус в диагностике вируса Эбштейна Барра. Серология ВЭБ может быть важна как дополнительная диагностика лимфопатии и неврологических заболеваний неясной этиологии. В контексте связанным с серологией ВЭБ определение EBNA-1 IgG является первым шагом. Положительный результат подтверждает прошедшую инфекцию. В случае отрицательного EBNA-1 результата, определяются VCA IgG и IgM необходимые для дифференциации статуса инфекции.

Постановка теста проходит быстро и просто. EBV EBNA-1-IgG-ELISA PK5 medac определяет IgG антитела к EBNA-1. Для достоверной оценки возможно использование калибровочной кривой для количественного определения концентрации антител.

Принцип теста



## СОДЕРЖИМОЕ УПАКОВКИ

Кат №: 126-РКС

1. 

<b>МТР</b>
------------

Микропланшета: 12 стрипов по 8 лунок, окрашены в синий цвет (с рамкой и влагопоглощающей прокладкой), ломающиеся стрипы, U-образной формы, покрыты рекомбинантным EBV EBNA-1 – вирусным антигеном, бычий сывороточный альбумин и рН индикатор, готов к использованию.
2. 

<b>КОНТРОЛЬ</b>	<b>-</b>
-----------------	----------

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

<b>КОНТРОЛЬ</b>	<b>+</b>
-----------------	----------

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

<b>КАЛИБРАТОР</b>	
-------------------	--

Калибратор: 1 флакон – 1,5 мл, человеческая сыворотка, готов к использованию, содержит FCS, бычий сывороточный альбумин, фенол, Проклин 300 и гентамицина сульфат.
5. 

<b>МОЩЬ БУФЕР</b>
-------------------

Концентрат моющего буфера: 1 флакон 100 мл, PBS/Твин(10X), рН 7.2–7.4, содержит Проклин 300.
6. 

<b>БУФЕР ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ ПРОБ</b>
----------------------------------

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.
7. 

<b>КОНЬЮГАТ</b>
-----------------

Конъюгат: 3 флакона по 4,5 мл каждый, козий анти – человеческий IgG, конъюгированный HRP, готов к использованию, окрашенный в зелёный цвет, содержит бычий сывороточный альбумин, фенол, Проклин 300 и гентамицина сульфат.
8. 

<b>ТМВ – СУБСТРАТ</b>
-----------------------

ТМВ-субстрат: 1 флакон 10 мл, готов к использованию.
8. 

<b>СТОП – РАСТВОР</b>
-----------------------

Стоп – раствор: 2 флакона по 11 мл каждый, 0,5 м серной кислоты (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), готов к использованию.

## **1. ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ**

<b>Материал/реагент</b>	<b>Состояние</b>	<b>Хранение</b>	<b>Стабильность</b>
Тест - упаковка	не открытая	2 - 8 °С	до истечения срока годности
Микро планшеты с антигенным покрытием	открытые	закрытые в алюминиевый пакет с осушителем- влагопоглотителем 2 - 8 °С	6 недель
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
Конъюгат	открытый	2 - 8 °С	6 недель
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. Aqua ad injectabilia (бидистиллированная вода). Использование деионизированной воды может привести к ошибкам при проведении 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 °С - 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 мощного буфера (10x) с девятью частями бидистиллированной воды (например, 50 мл. концентрата мощного буфера (10x) – с 450 мл. бидистиллированной воды). На каждый стрип необходимо 10 мл разведенного мощного буфера.

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

**Не смешивать реагенты одной партии (микропланшета, контроли, конъюгат, калибратор) с реагентами других партий или других производителей. Напротив, мощный 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 1:200 буфером для разведения проб. Мы рекомендуем приготовить исходное разведение 1:50 (например 10 мл сыворотки + 490 мл буфера для разведения проб). Далее 1:4 разведение готовится в нужных объемах. Образцы не за пределами измеряемого диапазона могут быть разведены далее.

## **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 ( $\pm 5$  мин) при температуре 37 °C ( $\pm 1$  °C) во влажной камере или заклеенными инкубационной оберточной фольгой.
- 5.4. После инкубации промыть стрипы три раза 200 мкл мощного 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!**

- 5.5. Добавить конъюгат (зеленого цвета) во все лунки (исключая A1).

**50 мкл конъюгата добавляется в лунки если процедура теста выполняется вручную.**

**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.**

- 5.6. Инкубировать в течение 60 мин. ( $\pm 5$  мин) при температуре 37° C ( $\pm 1$  °C) во влажной камере или заклеенными в инкубационную оберточную фольгу.
- 5.7. После инкубации снова промыть микрострипы (см.п.5.4).
- 5.8. Добавить во все лунки 50 мкл. ТМВ-субстрата и инкубировать в течение 30 минут ( $\pm 2$  мин) при температуре 37 °C ( $\pm 1$  °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.

**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	Калибратор	Образцы
Отр. Контроль	--	50 мкл	--	--	--
Пол. Контроль	--	--	50 мкл	--	--
Калибратор	--	--	--	50 мкл	--
Образцы	--	--	--	--	50 мкл
Инкубировать 60 мин. при 37° С, промыть 3 раза по 200 мкл промывающим буфером.					
Конъюгат	--	50/60 мкл*	50/60 мкл*	50/60 мкл*	50/60 мкл*
Инкубировать 60 мин. при 37° С, промыть 3 раза по 200 мкл промывающим буфером.					
ТМБ-субстрат	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Инкубировать 30 мин. при 37° С, в темноте.					
Стоп - раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
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 A1) из всех других значений ОП.

\* Лот-специфичные данные

К набору прилагается лист с лот-специфичными данными, содержащий следующую информацию:

- Лот-специфичная калибровочная кривая
- Значения а и b кривой

- Номинальное значение ОП калибратора
- Нижняя граница значения ОП калибратора
- Номинальное значение концентрации (УЕ/мл) Положительного контроля.

\* Критерии валидности

- Значение **ОП бланка** должно быть **< 0,150**
- Единица значения положительного контроля, должна быть внутри номинального значения лот-специфичных данных.
- Среднее значение ОП калибратора должно быть не менее значения нижней границы, указанной на листе с лот-специфичными данными.

**Тест необходимо повторить, если результаты не совпадают со спецификацией.**

Коррекция результатов

Полученные значения ОП Положительного контроля и образцов необходимо скорректировать по следующей формуле:

$$ОП_{\text{скорректированное}} = \frac{\text{Номинальное значение ОП калибратора}}{\text{Полученное значение ОП калибратора}} \cdot ОП_{\text{измеренное}}$$

\* Расчет результатов

Соответствующие концентрации скорректированных значений ОП в УЕ/мл могут быть считаны с лот-специфичной калибровочной кривой (см. лист с лот-специфичными данными).

Как альтернатива, концентрации могут быть рассчитаны по следующей формуле:

$$\text{Концентрация [Уе / мл]} = \frac{b}{\left( \frac{a}{ОП_{\text{скорректированное}}} - 1 \right)}$$

Большинство современных ИФА ридеров позволяют ввести формулу в программу, что позволяет полностью автоматизировать процесс.

Исследуемый диапазон составляет от 9 до 200 УЕ/мл. Образцы со значениями ниже данного диапазона интерпретируются как < 9 УЕ/мл, а со значениями выше > 200 УЕ/мл. Данные значения не экстраполируются.

**Cut-off = 10 УЕ/мл**

**Серая зона = cut off ± 10 % (=9 - 11 УЕ/мл)**

### **Внимание!**

Надлежащий математический алгоритм определения отрицательных или неопределенных  $U_e$  значений могут приобретать следующие значения:

- крайне высокие положительные значения с корректированной ОП  $\geq$  считаются отрицательными или неопределенными (исключено деление на ноль). Такие результаты, должны быть переисследованы в большем разбавлении или быть интерпретированы  $> 200 U_e$ .

### **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**

<b>EBNA-1-IgG</b>	<b>VCA-IgG</b>	<b>VCA-IgM</b>	<b>Interpretation</b>
-	-	-	серонегативный
+	+/ $\pm$ /-	-	Прошедшая инфекция
-	+/ $\pm$ /-	+	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 EBNA-1- IgG-ELISA PKS medac	отрицательный	114	0	0
	cut-off	0	0	0
	положительный	1	0	50

Чувствительность = 100 %

Специфичность = 99.1 %

Отрицательные предопределенные данные: 100 %

Положительные предопределенные данные: 98 %

Согласованность: 99.4 %

### 7.В. ТОЧНОСТЬ

образец	Колебания внутри теста				Sample	Колебания вне теста			
	номинальное AU	SD	CV (%)	n		номинальное AU	SD	CV (%)	n
PC	19.4	0.6	3	22	PC	19.6	0.5	3	11
N° 1	6.9	0.3	4	22	N° 6	7.3	0.3	4	11
N° 2	12.5	0.5	4	22	N° 7	13.4	0.6	4	11
N° 3	53.0	2.6	5	22	N° 8	50.4	3.9	8	11
N° 4	88.7	4.1	5	22	N° 9	96.5	7.1	7	11
N° 5	141.8	6.6	5	22	N° 10	155.0	13.6	9	11

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).