

## Zastosowanie

Zestaw DRG Epstein Barr Virus (VCA) IgM zapewnia materiały do pomiaru przeciwciał Epstein Barr (VCA) w klasie IgM w surowicy.

## Zasada Metody

Zestaw DRG Epstein Barr Virus (VCA) IgM ELISA Kit jest testem immunosorbcyjnym fazy stałej (ELISA). Mikrostudzienki jako faza stała są opłaszczane nieaktywnymi antygenami wirusa Epstein Barr (VCA).

Próbki są rozcieńczane Rozcieńczalnikiem Próbek i dodatkowo inkubowane z Sorbentem IgG-RF, zawierającym wysoce odpornościowe ludzkie przeciwciała klasy IgG aby wyeliminować konkurencyjne hamowanie przez specyficzne IgG i usunąć czynnik reumatoidalny. Ta obróbka wstępna pozwala uniknąć błędów w wynikach.

Rozcieńczone próbki oraz gotowe do użycia kontrole są pipetowane do studzienek. Podczas inkubacji specyficzne przeciwciała wirusa Epsteina-Barr (VCA) w próbkach i kontrolach są wiązane do unieruchomionych antygenów.

Po etapie przemywania, w którym usuwane są niezwiązane materiały próbki i kontroli peroksydaza chrzanowa sprzężona z ludzkim przeciwciałem IgM są dodawane do studzienek. Podczas drugiej inkubacji te koniugaty anty-IgM wiążą się specyficznie z przeciwciałami IgM powodując powstawanie kompleksów immunologicznych sprzężonych z enzymem.

Po drugim etapie płukania w celu usunięcia niezwiązanego koniugatu utworzone kompleksy immunologiczne (w przypadku wysokich wyników) są wykrywane przez inkubację z substratem TMB i rozwinięciem niebieskiego koloru. Niebieski kolor zamienia się w żółty, poprzez zatrzymanie reakcji enzymatycznej za pomocą kwasu siarkowego.

Intensywność tego zabarwienia jest wprost proporcjonalna do ilości specyficznych przeciwciał wirusa Epsteina- Barr (VCA ) w próbce. Absorbancja przy 450 nm jest odczytywana przy zastosowaniu czytnika mikroplętek ELISA.

**Ostrzeżenia i środki ostrożności:**

- Niniejszy zestaw przeznaczony jest wyłącznie do zastosowania diagnostycznego w warunkach in vitro.
- Przed rozpoczęciem oznaczenia należy uważnie przeczytać instrukcję obsługi. Należy posługiwać się aktualną wersją ulotki informacyjnej, dołączonej do zestawu. Należy upewnić się, że wszystko jest zrozumiałe.
- Wszystkie odczynniki niniejszego zestawu testowego, które zawierają ludzką surowicę lub osocze, przebadano z wynikiem ujemnym na obecność HIV I/II, antygenu HBs i HCV procedurami zatwierdzonymi przez FDA. Mimo tego, wszystkie odczynniki należy traktować jako potencjalnie zakaźne podczas pracy oraz utylizacji.
- Unikać kontaktu z Roztworem Stopującym zawierającym 0,2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Może powodować podrażnienia i poparzenia skóry.
- TMB ma drażniący wpływ na skórę i błony śluzowe. W przypadku ewentualnego kontaktu, przemyć oczy obfitą ilością wody i skórę mydłem z dużą ilością wody. Umyć zanieczyszczone przedmioty przed ich użyciem. W przypadku wdychania, wyprowadzić osobę na świeże powietrze.

- 
- Mikropłytką zawiera łamane paski. Niewykorzystane paski ze studzienkami muszą być przechowywane w temperaturze 2<sup>o</sup> do 8<sup>o</sup>C, w szczelnie zamkniętej torebce foliowej. Należy je stosować w ramce zawartej w zestawie.
  - Próbkę i odczynniki zestawu należy pipetować jak najszybciej, w tej samej kolejności w każdym etapie oznaczenia.
  - Należy używać jednego pojemnika tylko dla pojedynczego odczynnika. To szczególnie dotyczy pojemnika na substrat. Posługiwanie się pojemnikiem do odmierzania roztworu substratu, który wcześniej wykorzystywano do roztworu sprzężonego, może prowadzić do wystąpienia zabarwienia roztworu. Nie wlewać odczynników z powrotem do fiolek, gdyż może dojść do zanieczyszczenia odczynników.
  - Należy dobrze wymieszać zawartość mikropłytki, aby zagwarantować uzyskanie dobrych wyników oznaczenia. Nie stosować ponownie raz użytych studzienek.
  - Podczas oznaczenia nie wolno dopuścić do wyschnięcia studzienek odczynniki należy dodawać bezpośrednio po zakończeniu etapów wymywania.
  - Przed rozpoczęciem oznaczenia należy pozostawić odczynniki, aby osiągnęły temperaturę pokojową (21<sup>o</sup> - 26<sup>o</sup>C). Temperatura wpływa na odczyt absorbancji, natomiast nie ma wpływu na wyniki oznaczeń próbek pacjentów.
  - Nigdy nie pipetować ustami i unikać kontaktu odczynników i próbek ze skórą i błonami śluzowymi.
  - Nie palić, nie jeść, nie pić i nie stosować kosmetyków w miejscach, gdzie stosuje się próbki i odczynniki zestawu.

- 
- Przy postępowaniu się próbkami i odczynnikami stosować jednorazowe rękawiczki lateksowe. Zanieczyszczenie odczynników lub próbek drobnoustrojami może prowadzić do uzyskania fałszywych wyników.
  - Próbkami i odczynnikami należy postępować zgodnie z procedurami określonymi w odpowiednich krajowych wytycznych i regulacjach dotyczących bezpieczeństwa biologicznego.
  - Nie stosować odczynników po upływie terminu ważności podanego na etykietach zestawu.
  - Należy przestrzegać wszystkich objętości podanych w protokole. Optymalne wyniki oznaczenia można uzyskać tylko przy stosowaniu kalibrowanych pipet.
  - Nie mieszać i nie stosować elementów zestawów o różnych numerach serii. Zaleca się nie wymieniać zagłębień z różnych płytek nawet w obrębie tej samej serii. Zestawy mogą być transportowane lub przechowywane w różnych warunkach i charakterystyki wiązania płytek mogą się nieznacznie różnić.
  - Substancje chemiczne i przygotowane lub stosowane należy traktować odczynniki jak niebezpieczne odpady, zgodnie z krajowymi wytycznymi lub regulacjami dotyczącymi bezpieczeństwa biologicznego.
  - Informacje dotyczące niebezpiecznych substancji zawartych w zestawie można znaleźć w Karcie Charakterystyki Substancji Niebezpiecznej. Karty Charakterystyki Substancji

---

**Elementy Zestawu**

1. **Mikrostudzienki**, 12x8 (odłamywane) paski, 96 studzienek;

Studzienki opłaszczony nieaktywnym antygenem kapsydowym wirusa Epstein Barr  
(dodatkowo 1 ramka i 1 folia do przykrycia płytki)

2. **Rozcieńczalnik Próbkki\***, 1 fiolka, 100 mL, gotowy do użycia;

Żółty kolor, pH 7,2 +/- 0,2

Zawiera ludzkie p-ciała klasy IgG

3. **Sorbent IgG-RF\***, 1 fiolka; 6,5 mL, gotowy do użycia;

Kolor żółty

Zawiera ludzkie p-ciała klasy IgG

4. **Kontrola Wysoka\***, 1 fiolka, 1 mL, gotowa do użycia

Kolor żółty, czerwona nakrętka

5. **Kontrola Niska\***, 1 fiolka, 2 mL, gotowa do użycia

Kolor żółty, żółta nakrętka

6. **Kalibrator\***, 1 fiolka, 2 mL, gotowa do użycia

Kolor żółty, czarna nakrętka

7. **Konjugat Enzymu\***, 1 fiolka, 20 mL, gotowy do użycia;

Kolor czerwony

Przeciwciało ludzkiego IgM sprzężone z peroksydazą chrzanową

8. **Roztwór Substratu**, 1 fiolka; 14 mL; gotowy do użycia

Tetrametylbenzydyna (TMB)

9. **Roztwór Stopujący**, 1 fiolka, 14 mL, gotowy do użycia,

Zawiera 0,2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Unikać kontaktu z R-rem Stopującym. Może powodować podrażnienia i oparzenia skóry.

10. **Roztwór Płuczący\***, 1 fiolka, 30 mL (stężony 20x dla 600ml), pH 6,5+/- 0,1

Patrz Przygotowanie Odczynników

\*\* Konserwanty nie zawierają rtęci

---

**Materiały Niezbędne, Nie Zawarte w Zestawie**

- Skalibrowany czytnik płytek (450/620±10 nm)
- Kalibrowane nastawne precyzyjne mikropipety.
- Inkubator 37 C
- Manualny lub automatyczny sprzęt do płukania
- Vortex lub mieszadło
- Dejonizowana lub (świeżo) destylowana woda
- Stoper
- Bibuła.

**Warunki Przechowywania**

Nieotwarte odczynniki, przechowywane w temperaturze 2 °C do 8 °C., zachowują reaktywność do upływu terminu ważności. Nie stosować odczynników po tej dacie.

Otwarte odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2 °C do 8 °C Studzienki muszą być przechowywane w temperaturze 2 °C do 8 °C. Po otwarciu torebki foliowej należy uważnie zamknąć ją szczelnie ponownie.

Otwarte zestawy zachowują aktywność przez 2 miesiące, jeżeli są przechowywane w wyżej opisanych warunkach.

DRG



DRG<sup>®</sup> Epstein-Barr Virus (EBV) - [VCA] IgM (EIA-3476)



Revised 24 Apr. 2012 rm (Vers. 10.1)

USA: 

### **Przygotowanie Odczynników**

Doprowadzić odczynniki i wymaganą ilość pasków do temperatury pokojowej przed użyciem

### **Roztwór Płuczący**

Rozcieńczyć Roztwór Płuczący 1+19 (np. 10 mL + 190 mL) świeżą i wolną od bakterii destylowaną wodą. Rozcieńczony Roztwór Płuczący ma pH 7,2 +/- 0,2.

Zużycie: ~ 5 mL na oznaczenie

Kryształ w roztworze zanikają poprzez ogrzanie do temperatury 37 C w kąpeli wodnej. Upewnić się, że kryształ całkowicie się rozpuścił przed użyciem.

Rozcieńczony Roztwór Płuczący jest stabilny przez 4 tygodnie w 2 °C do 8 °C.



**DRG****DRG<sup>®</sup> Epstein-Barr Virus (EBV) - [VCA] IgM (EIA-3476)**

Revised 24 Apr. 2012 rm (Vers. 10.1)

USA: **Utylizacja zestawu**

Zestaw należy wyrzucać zgodnie z krajowymi przepisami prawnymi. Specjalne informacje dotyczące niniejszego produktu zawarte są w Karcie Charakterystyki Substancji Niebezpiecznej.

**Uszkodzone zestawy**

W przypadku każdego poważnego uszkodzenia zestawu testowego lub jego elementów należy poinformować o tym pisemnie DRG<sup>®</sup>, nie później niż jeden tydzień po otrzymaniu zestawu. Nie należy w oznaczeniu stosować poważnie uszkodzonych pojedynczych elementów zestawu. Należy je przechowywać do momentu uzgodnienia ostatecznego rozwiązania. Następnie należy się ich pozbyć zgodnie z obowiązującymi przepisami prawnymi.

**Materiał badany**

W oznaczeniu można stosować próbki surowicy.

Nie używać próbek z silną hemolizą, żółtaczkowych ani lipemicznych.

**Surowica:**

Pobrać krew z żyły (np. przy użyciu Sarstedt Monovette nr 02.1388.001), pozostawić do wytworzenia skrzepu i oddzielić surowicę przez wirowanie w temperaturze pokojowej. Nie wirować próbek przed wytworzeniem skrzepu. U pacjentów otrzymujących leki przeciwkrzepliwie czas powstawania skrzepu może być wydłużony.

## Przechowywanie i preparatyka próbek

Próbki należy zamknąć korkiem i można je przechowywać przed oznaczeniem przez maksymalnie 24 godziny w temperaturze 2 - 8°C. Próbki przechowywane przez dłuższy czas przed oznaczeniem należy zamrozić, jednorazowo, w temperaturze - 20°C. Rozmrożone próbki przed oznaczeniem należy kilkakrotnie odwrócić

## Rozcieńczenie Próbek

Przed oznaczeniem rozcieńczyć każdą próbkę Rozcieńczalnika Próbek. Aby zabsorbować czynnik reumatoidalny, rozcieńczone próbki należy inkubować z Sorbentem IgG-RF.

1. Rozcieńczyć każdą próbkę 1+50 Rozcieńczalnikiem Próbek;  
Np. 10 uL próbki + 0,5 mL Rozcieńczalnika, dobrze wymieszać.
2. Rozcieńczyć wstępnie rozcieńczone próbki 1 + 1 Sorbentem IgG-RF  
Np. 60 uL wstępnie rozcieńczonej próbki + 60 uL Sorbentu IgG-RF, dobrze wymieszać.
3. Pozostawić na co najmniej 15 minut w temperaturze pokojowej lub na całą noc w temperaturze 2°- 8°C i dobrze wymieszać.
4. Pobrać 100 uL tak przygotowanej próbki do testu ELISA.

Uwaga: Kontrole są gotowe do użycia i nie muszą być rozcieńczane.

## Procedura Oznaczenia

### Ogólne uwagi

- Przed użyciem wszystkie odczynniki i próbki należy pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Wszystkie odczynniki należy wymieszać bez wytwarzania piany.
- Po rozpoczęciu oznaczenia wszystkie jego etapy należy wykonywać bez przerw.
- Dla uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego, należy stosować nowe jednorazowe plastikowe końcówki pipet do pipetowania każdego standardu, kontroli i próbki.
- Absorbancja jest funkcją czasu inkubacji i temperatury. Przed rozpoczęciem oznaczenia zaleca się przygotowanie wszystkich odczynników, zdjęcie korków, umieszczenie wszystkich potrzebnych zagłębień w statywie, itp. Dzięki temu każdy etap pipetowania zajmie taką samą ilość czasu i nie będzie pomiędzy nimi żadnych przerw.
- Zgodnie z ogólną zasadą, reakcja enzymatyczna jest liniowo proporcjonalna do czasu i temperatury.
- Zamknąć szczelnie fiołki po użyciu odczynnika, aby uniknąć zanieczyszczenia
- Aby uniknąć skażenia krzyżowego i fałszywie podwyższonych wyników pipetować próbki i konjugat bez rozpryskiwania wprost do dna probówek

Podczas inkubacji przykryć płytkę folią aby zapobiec wyparowaniu.

**Procedura testu**

1. Przed rozpoczęciem testu, rozcieńczyć Roztwór Płuczący, przygotować próbki, jak opisano w pkt 5.3, wymieszać dobrze przez pipetowaniem i ustalić plan dystrybucji i identyfikacji dostarczony w zestawie dla wszystkich próbek i kontroli. Wybrać odpowiednią liczbę pasków lub studzienek i umieścić je w ramce.

Proszę przeznaczyć co najmniej:

1 studzienkę (np. A1) dla próbki ślepej

1 studzienkę (np. B1) dla Kontroli Niskiej

2 studzienki ( np. C1 i D1) dla Kalibratora

1 studzienkę (np. E1) dla Kontroli Wysokiej

Od użytkownika zależy czy kontrole i próbki będą oznaczane w duplikacie.

2. Dodać:

100 uL Kontroli Niskiej            do B1

100 uL Kalibratora                do C1 i D1

100 uL Kontroli Wysokiej        do E1

100 uL każdej rozcieńczonej próbki z nową końcówką do odpowiednich studzienek.

Zostawić A1 na ślepy substrat.

3. Przykryć studzienki folią. Inkubować 60 minut w 37 °C.

4. Energicznie wytrząsnąć zawartość studzienek

Płukać studzienki 5 x Roztworem Płuczającym ( 300 uL na studzienkę). Uderzyć płytką mocno o papier pochłaniający aby usunąć zalegające kropelki.

Ważna uwaga: Na Czułość i precyzję oznaczenia ma wpływ poprawne wykonanie etapu płukania!

5. Dodać 100 mL Konjugatu Enzymu do wszystkich studzienek oprócz A1.

6. Inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej (20 °C do 25 °C).

Nie wystawiać na bezpośrednie działanie promieni słonecznych.

7. Energicznie wytrząsnąć zawartość studzienek

Płukać studzienki 5 x Roztworem Płuczającym ( 300 uL na studzienkę). Uderzyć płytką mocno o papier pochłaniający aby usunąć zalegające kropelki.

8. Dodać 100 uL Roztworu Substratu do wszystkich studzienek.

9. Inkubować dokładnie 15 minut w temperaturze pokojowej (20 °C do 25 °C) w ciemności.

10. Zatrzymać reakcję enzymatyczną poprzez dodanie 100 uL Roztworu Stopującego do każdej studzienki.

Kolor niebieski jaki rozwinął się podczas inkubacji zmienia się na żółty

Uwaga: Próbkę o wysokiej zawartości parametru mogą powodować ciemne precypitaty chromogenu!

11. Odczytać gęstość optyczną przy 450/620 nm przy użyciu czytnika płytek w ciągu 30 minut od dodania Roztworu Stopującego.

DRG



DRG<sup>®</sup> Epstein-Barr Virus (EBV) - [VCA] IgM (EIA-3476)



Revised 24 Apr. 2012 rm (Vers. 10.1)

USA: 

## Pomiar

Wyregulować czytnik ELISA do zera względem ślepego substratu w studzience A1.

Jeżeli z powodów technicznych nie można wyzerować czytnika przy użyciu ślepego substratu w studzience A1, należy odjąć wartość absorbancji studzienki A1 od innych zmierzonych wartości absorbancji w celu uzyskania wiarygodnych wyników!

Pomiar absorbancji wszystkich studzienek przy 450 nm i odnotować wartości dla każdej kontroli i próbki w schemacie dystrybucji identyfikacji.

Zalecany jest podwójny odczyt przy użyciu fali referencyjnej 620 nm.

Obliczyć średnie wartości absorbancji wszystkich duplikatów.

**Obliczenia**

Średnia wartość absorbancji Kontroli Odcięcia (Cut-off)[CO]

Obliczyć średnią absorbancję dla dwóch pomiarów Kontroli Odcięcia (np. C1/D1)

Przykład:  $(0,49 + 0,51) : 2 = 0,50 = \text{CO}$

(Średnie OD próbki  $< 0,9 \times \text{CO}$ )

Wyniki w jednostkach DRG [DRG Units (DU)]

Średnia wartości absorbancji x 10 = [DU]

CO

Przykład:

1,580 x 10 = 32 DU

0,50

## Kontrola Jakości

Zaleca się używać próbek kontrolnych zgodnie z przepisami krajowymi i federalnymi. Stosowanie próbek kontrolnych jest zalecane w celu zapewnienia walidacji wyników dzień po dniu. Używać kontroli na poziomie zarówno normalnym, jak i patologicznym. Kontrole i odpowiednie wyniki QC są zamieszczone w certyfikacie QC dodanym do zestawu. Wartości i zakresy kontroli podane w arkuszu QC zawsze odnoszą się do bieżącej serii zestawu i powinny być wykorzystywane do bezpośredniego porównania wyników.

Zaleca się również, aby korzystać z krajowych lub międzynarodowych programów oceny jakości w celu zapewnienia dokładności wyników. Należy użyć odpowiednich metody statystycznych do analizy wartości kontrolnych. Jeżeli wyniki testu nie pasują do ustalonych dopuszczalnych zakresów materiałów kontrolnych wyniki pacjentów powinny być traktowane jako nieważne.

W tym przypadku, należy sprawdzić następujące obszary techniczne: pipetowanie i urządzenia do pomiaru czasu, fotometr, daty ważności odczynników, warunki przechowywania i inkubacji, aspiracja i metody mycia. Po sprawdzeniu wyżej wymienionych elementów bez znalezienia przyczyny należy skontaktować się z DRG.



**DRG****DRG<sup>®</sup> Epstein-Barr Virus (EBV) - [VCA] IgM (EIA-3476)**

Revised 24 Apr. 2012 rm (Vers. 10.1)

USA:

**Aspekty Prawne****Wiarygodność Wyników**

Test należy przeprowadzić zgodnie z instrukcjami producenta. Ponadto użytkownik powinien ściśle stosować się do zasad dobrej praktyki laboratoryjnej (Good Laboratory Practice) lub innych obowiązujących norm i/lub przepisów krajowych. Jest to szczególnie ważne przy stosowaniu odczynników kontrolnych. Ważne jest, aby zawsze używać w procedurze badania odpowiednią ilość kontroli dla walidacji dokładności i precyzji testu.

**Odpowiedzialność**

Wszelkie modyfikacje w zestawie i/lub wymiany, bądź mieszanie dowolnych odczynników z odczynnikami innej serii może mieć negatywny wpływ na wyniki i ważność całego testu. Taka modyfikacja i/lub zamiana unieważnia wnioski o wymianę. Roszczenia zgłoszone z powodu błędnej interpretacji wyników laboratoryjnych klienta są nieważne. Niezależnie od tego, w przypadku jakichkolwiek roszczeń, odpowiedzialność producenta nie przekracza wartości zestawu testowego. Szkody wyrządzone w zestawie testowym podczas transportu nie podlegają odpowiedzialności producenta.

DRG



DRG<sup>®</sup> Epstein-Barr Virus (EBV) - [VCA] IgM (EIA-3476)



Revised 24 Apr. 2012 rm (Vers. 10.1)

USA: 

---





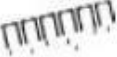




## LITERATURA

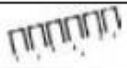






Lamy ME., Favart AM., Cornu A. et al., "Study of Epstein-Barr virus (EBV) antibodies: IgG and IgM anti-VCA, IgG anti EA and Ig anti-EBNA obtained with an original microtiter technique. Serological criterions of primary and recurrents EBV infections and follow-up of infectious mononucleosis. Seroepidemiology of EBV in Belgium based on 5178 sera from patients". Acta Clin. Belg., 37 (5): 281-298, (1982)

Lennette E., „Epstein-Barr Virus“, in Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. Washington D.C., Am. Soc. Microbiol. P 728-732, (1985)

Luka J., Chase PC., Pearson GR., "A sensitive enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) against the major EBV-associated antigens. I-Correlation between ELISA and immunofluorescence titers using purified antigens", J. Immunol. Metho., 67: 145-156, (1984)

## Skrócona Instrukcja Użycia

	Wszystkie odczynniki i próbki powinny być doprowadzone do temperatury pokojowej (18-25°C) przed użyciem.
	Pozostawić studzienkę A1 dla substratu Ślepego. Dodać 100 uL Kontroli do odpowiednich studzienek.
	Dodać 100 uL próbek do odpowiednich studzienek. (Uwaga: Zapoznać się z punktem <i>Przygotowanie Próbek</i> )
	Przykryć studzienki folią. Unkubować 60 minut w 37°C.
	Energicznie wytrząsnąć zawartość studzienek.
	Płukać studzienki 5 razy przy pomocy Roztworu Płuczącego (300 uL/studzienkę).
	Mocno uderzyć studzienkami o papier pochłaniający, aby usunąć zalegające kropelki.
	Dodać 100 uL Konjugatu Enzymu do wszystkich studzienek.
	Inkubować 30 minut w temperaturze pokojowej.

	<b>Energicznie wytrząsnąć zawartość studzienek.</b>
	<b>Przepłukać studzienki 5 razy przy pomocy Roztworu Płuczącego (300 uL/studzienkę).</b>
	<b>Mocno uderzyć studzienkami o papier pochłaniający, aby usunąć zalegające kropelki.</b>
	<b>Dodać 100 uL Roztworu Substratu do każdej studzienki.</b>
 15 min	<b>Inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej.</b>
	<b>Zatrzymać reakcję poprzez dodanie 100 uL Roztworu Stopującego.</b>
	<b>Odczytać absorbancję przy długości fali 450 nm.</b>