

## НАБОР ИФА

# ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К ВИРУСУ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 1 И 2 ТИПА (ВПГ-1+2)

### EIA-3489, Herpes Simplex Virus Type 1+2 IgG ELISA

Каталог. № : EIA-3489

Методика от 12-2012

Количество : 96

Версия 9.0

Производитель: DRG (Германия)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

#### 1. ВВЕДЕНИЕ

Набор DRG Herpes Simplex Virus Type 1+2 IgG ELISA предоставляет материалы для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к ВПГ-1,2 в сыворотке человека.

**Данный анализ предназначен только для диагностического использования in vitro.**

#### 2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор DRG Herpes Simplex Virus Type 1+2 IgG ELISA является твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA).

Микротитровальные лунки в качестве твердой фазы покрыты антигенами ВПГ-1,2. Разведенные образцы пациента и готовые к использованию контроли пипетируются в лунки. Во время инкубации специфичные к ВПГ-1,2 антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляются антитела IgG, конъюгированные пероксидазой хрена. Во время второй инкубации этот анти-IgG конъюгат связывается только с антителами IgG, в результате чего формируются иммунные комплексы с ферментативными связями.

После второй промывки (для удаления несвязанного конъюгата) сформированные иммунные комплексы (в случае положительного результата) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ, в результате чего появляется голубое окрашивание. Голубое окрашивание меняется на желтое при добавлении серной кислоты для остановки индикаторной реакции.

Интенсивность данного окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител IgG специфичных к ВПГ-1,2. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA считывателе.

#### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Данный набор предназначен только для использования в диагностике in vitro.
- Все реагенты этого набора, которые содержат человеческую сыворотку или плазму, тестировались и подтверждены FDA методиками как отрицательные к ВИЧ-1,2, поверхностному антигену гепатита В и вирусу гепатита С. Однако, во время использования и уничтожения все реагенты следует рассматривать как потенциально биологически опасные.
- Контроли и стандарты в культурах клеток оказались неинфекционными.
- Избегайте контакта со стоп раствором, содержащим 0.5 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Он может вызывать раздражение кожи и ожоги.
- Никогда не раскапывайте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми оболочками.
- Не курите, не принимайте пищу, не пейте и не наносите косметику на территории, где обрабатываются образцы или реагенты набора.
- Надевайте одноразовые перчатки из латекса при обработке образцов и реагентов. Микробиологическое заражение реагентов или образцов может дать ошибочные результаты.
- Обращение должно соответствовать процедурам, указанным в соответствующих государственных руководствах или правилах по биологической безопасности.
- Не используйте реагенты после даты истечения срока годности, которая указана на этикетках набора.
- Согласно протокола анализа необходимо следовать всем рабочим объемам реагентов.

- Использование калиброванных пипеток и считывающих устройств пластины микротитратора. Оптимальные результаты анализа можно получить только при использовании откалиброванных дозаторов и микротитровальных планшеточных считывателей.
- Не смешивайте и не используйте компоненты наборов с различными номерами партий. Рекомендуется не заменять лунки различных планшетов, даже одной и той же партии. Возможно, что наборы поставлялись и хранились в различных условиях, и связывающие качества планшетов могут в некоторой степени отличаться.
- Исходя из соответствующих государственных руководств или правил по биологической безопасности, химические вещества, и подготовленные или использованные реагенты должны рассматриваться как опасные отходы.
- За информацией относительно опасных веществ, входящих в набор, просьба обращаться к Спецификациям Безопасности Материала. Спецификации Безопасности Материала предоставляются по запросу непосредственно от компании DRG Instruments GmbH. Спецификации Безопасности Материала соответствуют требованиям ЕС-Руководства 91/155 ЕС.

#### 3. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

##### 3.1 Содержимое набора

1. **Микротитровальные лунки:** лунки (12x8 лунок).
2. **Раствор для разведения образцов:** Желтого цвета: 1 флакон (100 мл), pH 7,2 ± 0,2.
3. **Положительный контроль:** Желтого цвета. Красный колпачок: 1 флакон (2 мл).
4. **Отрицательный контроль:** Желтого цвета. Желтый колпачок: 1 флакон (2 мл).
5. **Cut-off контроль (готов к использованию):** Желтого цвета. Черный колпачок: 1 флакон (2 мл).
6. **Ферментный конъюгат:** Красного цвета: 1 флакон (20 мл).
7. **ТМБ – раствор субстрата (готов к использованию):** 1 флакон (14 мл).
8. **Стоп-раствор:** 0,2 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 1 флакон (14 мл).
9. **Промывочный раствор (20x концентрат для 600 мл, pH 7,2 +/- 0,2):** 1 флакон (30 мл). См. «Приготовление реагентов».

\*⇒ содержит безртутный консервант

##### 3.1.1 Необходимые но не поставляемые материалы

- Микротитрационный откалиброванный планшет-ридер (450/620нм +/- 10нм).
- Откалиброванные микропипетки разного объема.
- Инкубатор на 37°C.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Вихревой трубочный смеситель.
- Деионизированная или (только что) дистиллированная вода.
- Таймер.
- Промокательная бумага.

##### 3.2 Хранение и стабильность набора

При температуре хранения от 2 до 8°C не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. После истечения этой даты реагенты не использовать.

Открытые реагенты должны храниться при 2-8°C. Микротитровальные лунки должны храниться при 2-8°C. Как только пакет из фольги был открыт, следует быть внимательным чтобы его снова плотно закрыть.

Вскрытые наборы сохраняют активность в течение 2 месяцев при соблюдении вышеуказанных условий хранения.

##### 3.3 Подготовка реагентов

Перед использованием приведите все реагенты и необходимое количество полосок к комнатной температуре.

##### Промывочный раствор

Разбавить промывочный раствор 1+19 (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий редистиллированной водой.

Потребление: ~5 мл на определение.

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °C на водяной бане. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 4 недель при 2+8°C.

##### 3.4 Уничтожение набора

Утилизацию набора необходимо осуществлять в соответствии с государственными правилами. Специальная информация о данном наборе предоставлена в Паспорте безопасности (см. Раздел 13 в данной инструкции).

##### 3.5 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, необходимо проинформировать об этом компанию DRG в письменной форме не позднее 1 недели после получения набора. Сильно поврежденные отдельные компоненты не должны использоваться в анализе. Они должны храниться до достижения окончательного решения. После этого они должны быть уничтожены согласно официальным правилам.

#### 4. ОБРАЗЦЫ

В данном исследовании может использоваться сыворотка. Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

##### 4.1 Забор образцов

###### Сыворотка:

Забрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться и отделить центрифугированием сыворотку при комнатной температуре.

##### 4.2 Хранение образцов

Перед исследованием образцы должны храниться накрытыми в течение 24 часов при температуре 2-8°C. Образцы, хранящиеся в течение более долгого срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20°C. Оттаявшие образцы перед исследованием необходимо несколько раз перевернуть.

##### 4.3 Разведение образцов

Перед анализом разбавить сначала каждый образец пациента разбавителем образца **1+100**, напр., 10 мкл образца + 1 мл раствора для разбавления образца (**хорошо смешать, оставить по крайней мере на 15 минут и снова хорошо перемешать.**

**Примечание:** Контроли готовы к использованию и их не надо разводить!

#### 5. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

##### 5.1 Общие замечания

- Внимательно прочитайте протокол перед выполнением анализа. Надежность результатов зависит от четкого следования описанному протоколу анализа.
- **Очень важно перед началом процедуры анализа все реагенты, образцы и контроли довести до комнатной температуры.**
- Как только начался анализ, все этапы должны быть завершены без прерывания.
- Во избежание перекрестного загрязнения, используйте новые одноразовые пластмассовые наконечники для каждого стандарта, контроля или образца.
- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, снять крышки, установить лунки в рамку и т.д. Это обеспечит равномерное распределение времени для каждого этапа пипетирования без остановки.
- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.
- Чтобы избежать испарения и микробиологического загрязнения, плотно закройте флаконы с реагентами непосредственно после их использования.
- После первого вскрытия и последующего хранения проверьте конъюгат и флаконы контролей на микробиологическое загрязнение для дальнейшего использования.
- Во избежание перекрестного загрязнения и ошибочно высоких результатов, раскапывайте образцы пациентов и распределяйте конъюгат на дно лунок аккуратно без разбрызгивания.
- Во время инкубации накрывайте микротитровальные полоски фольгой, чтобы избежать испарения.

##### 5.2 Процедура анализа

Перед проведением анализа необходимо разбавить промывочный раствор, **приготовить образцы пациентов как описано в п. 5.3**. Перед пипетированием хорошо перемешайте и составьте **схему распределения и идентификации** с помощью формы вложенной в набор.

1. Отобрать требуемое количество микротитровальных стрипов или лунок и поместить их в держатель.  
Разместите по меньшей мере:  
1 лунка (напр., A1) для бланка субстрата  
1 лунка (напр., B1) для отрицательного контроля  
2 лунки (напр., C1+D1) для Cut-off контроля и  
1 лунка (напр., E1) для положительного контроля.  
На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублиях.
2. Раскапать:  
100 мкл отрицательного контроля в лунку B1

100 мкл Cut-off контроля в лунки C1 и D1  
100 мкл положительного контроля в лунку E1 и  
100 мкл **каждого разведенного** образца пациента с **новыми одноразовыми наконечниками** в оставшиеся лунки согласно схеме. Оставить лунку A1 для бланка субстрата!

3. Накрывать лунки пленкой поставляемой в наборе. Инкубировать: **1 час при 37 °C**.
4. Резко вытряхните содержимое лунок. Промойте их **5 раз 300 мкл/лунку** рабочего промывочного раствора. В конце осторожно удалить остатки жидкости выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!  
**Примечание:**  
*Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.*
5. Раскапать **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки, **кроме A1** и накрыть их пленкой.
6. Накрывать лунки пленкой. Инкубировать: **30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °C)**. Не подвергать воздействию прямого солнечного света!
7. Повторить процедуру промывки как описано в этапе 4.  
**Примечание:** *осторожно удалить остатки жидкости, выстучав стрипы на салфетку!*
8. Раскапать **100 мкл** раствора субстрата **во все** лунки
9. Накрывать и инкубировать: **ровно 15 минут при комнатной температуре (20 ± 25 °C) в темноте.**
10. Остановить ферментную реакцию путем внесения **100 мкл** стоп-раствора **в каждую** лунку. Любое голубое окрашивание проявившееся во время инкубации переходит в желтое.  
**Примечание:** *высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!*
11. Считать оптическую плотность при **450/620 нм** с помощью микротитрационного планшетного ридера в течение **30 минут** после внесения стоп-раствора.

##### 5.3 Измерение

**Настроить** микропланшетный ридер для ELISA на нуль используя **бланк субстрата в лунке A1**.

Если по техническим причинам ELISA ридер не может быть настроен на нуль используя бланк субстрат в лунке A1, вычитайте значение абсорбции лунки A1 из всех остальных значений абсорбции. Измерить абсорбцию во всех лунках при 450 нм и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в схему.

**Двойная длина волны – рекомендуется считать на 620 нм как референтной длине волны.** Где применимо рассчитать среднее значение абсорбции всех дублей.

#### 6. РЕЗУЛЬТАТЫ

##### 6.1 Надежность процесса анализа

Постановка анализа может считаться **действительной** при соблюдении следующих условий:

- **Бланк субстрата в A1:** ⇒ значение абсорбции менее **0.100**.
- **Отриц. контроль в B1:** ⇒ значение абсорбции менее **0.200**.
- **Cut-off контроль в C1/D1:** ⇒ значение абсорбции между **0.350 - 0.850**.
- **Полож. контроль в E1:** ⇒ значение абсорбции более **0.650 - 3.000**

##### 6.2 Вычисление

Значение средней абсорбции Cut-off контроля (CO). Вычислите значение средней абсорбции двух (2) определений cut-off контролей (напр: в C1/D1).

**Пример:**  $(0,44 + 0,46) : 2 = 0,50 = CO$

##### 6.3 Интерпретация

Средние значения абсорбции образцов пациента  
более чем на **10 % выше CO**  
⇒ **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

(Средние) значения абсорбции пациентов  
от **10 % выше до 10 % ниже CO**  
⇒ **серая зона ⇒ повторить анализ**

2 - 4 недели спустя – на новых пробах пациентов

результат второго анализа опять в «серой зоне»  
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

средние значения абсорбции пациента более чем **10%**  
ниже CO  
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

### 6.3.1 Результаты в DRG единицах [DU]

среднее значение абсорбции пациента x 10	
-----	= [DRG UNITS = DU]
CO	

тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

**Пример:** 1.580 x 10/ 0.45 = 35 DU

#### Интерпретация результатов

Значение Cut-off: 10 DU  
Серая зона: 9 – 11 DU  
Отрицательный: < 9 DU  
Положительный: > 11 DU

### 7. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с нормами федеральных и государственных прав. Использование контрольных образцов обеспечивает достоверность результатов анализа. Используйте контроли на нормальном и патологическом уровнях.

Так же рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для обеспечения точных результатов анализа.

Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и отклонений. Если результаты анализа не соответствуют установленным допустимым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента необходимо рассматривать как недействительные. В этом случае, проверьте следующие технические данные: приборы для пипетирования, фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирационные и промывочные методы.

В случае проверки всех выше перечисленных пунктов вы не обнаружили никаких неисправностей, обратитесь к вашему дистрибьютору или же непосредственно в компанию DRG.

### 8. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

#### 8.1 Диагностическая специфичность

Ещё не определена.

#### 8.2 Диагностическая чувствительность

Ещё не определена.

### 9. ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Бактериальное загрязнение или повторные циклы замораживания-оттаивания образца могут повлиять на значения плотности.

### 10. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ

#### 10.1 Достоверность результатов

Тест должен проводиться точно с инструкцией производителя. Также пользователь должен следовать национальным стандартам и законам. Это особенно относится к использованию контролей. Очень важно всегда включать в анализ достаточное количество контролей для оценки достоверности и точности анализа.

Тестовые результаты достоверные, только если контроли попадают в указанные границы и если все другие параметры соответствуют спецификации.

#### 10.2 Терапевтические заключения

Терапевтическое заключение никогда не должно основываться на результатах лабораторных исследований. Оно должно учитывать полностью всю клиническую картину пациента.

Тестовые результаты не должны быть единственным фактором, на основе которого ставится терапевтическое заключение.

#### 10.3 Надежность

Любые изменения набора и/или смешивания компонентов разных лотов могут отрицательно влиять на результаты теста.

Такие модификации не могут быть причиной для замены набора.

Любые повреждения при транспортировке набора не является под ответственностью производителя.

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»



**ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005