



Вирус простого герпеса 1 типа (ВПГ-1)

Кат. № : 3485
Количество : 96
Производитель : DRG (Германия)

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

Методика от 12-2007

1. Введение

Набор иммуноферментного анализа для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к Вирусу простого Герпеса 1-типа в сыворотке человека.

2. Принцип анализа

Набор **DRG HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 IgG ELISA** это набор для детекции антител класса IgG к ВПГ-1 в сыворотке человека.

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

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляются антитела IgG к ВПГ-1, конъюгированные пероксидазой хрена. Во время второй инкубации этот 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 окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител IgG специфичных к ВПГ-1. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA - ридере.

3. Предостережения

- Данный набор предназначен только для диагностики «ин-витро».
- Не использовать вместе реагенты или стрипы из разных лотов.
- Не использовать вместе реагенты разных производителей.
- Не использовать реагенты после окончания срока годности, указанного на этикетке.
- Использовать только чистые наконечники для пипеток, пипетки и лабораторный инвентарь.
- Не путать колпачки реагентов во избежание кросс-контаминации.
- Плотно закрывать флаконы с реагентами сразу после использования.
- После первого открывания и последующего хранения проверять флаконы конъюгата и контролей на микробную контаминацию перед дальнейшим использованием.
- **Во избежание кросс-контаминации и ложно завышенных результатов пипетировать образцы пациентов и раскапывать конъюгат без расплескивания прямо на дно лунок.**
- Во время инкубации накрывать микротитровальные стрипы пленкой для предотвращения испарения.

4. Компоненты набора

1. Микротитровальные стрипы с ВПГ 1 антигенами (IgG) 12x8- делимых стрипов с антигенами ВПГ-1, вкл. 1 держатель для стрипов и 1 пленку для накрывания.
2. Раствор для разведения образцов IgG ***, 100 мл готов к употреб., желтого цвета; pH 7.2 ± 0.2. Содержит анти человеческие антитела класса IgG.
3. Положительный контроль IgG ***, 2 мл готов к употреб., желтого цвета красный колпачок.
4. Отрицательный контроль IgG ***, 2 мл готов к употреб., желтого цвета, желтый колпачок.
5. Cut-off контроль IgG ***, 2 мл готов к употреб., желтого цвета, черный колпачок.

6. Ферментный конъюгат **, 20 мл готов к употреб., красного цвета, антитела к человеческому IgG, конъюгированные пероксидазой хрена.

7. Раствор субстрата, 14 мл готов к употреб., ТМБ.

8. Стоп-раствор, 14 мл готов к употреб., содержит 0,5 моль/л H₂SO₄.

Предупреждение

Серная к-та раздражает глаза и кожу.

9. Промывочный раствор*, 30 мл концентрация 20x на 600 мл; pH 7.2 ± 0.2. см. „Подготовка реагентов“.

*⇒ содержит 0.03 % ProClin 300

**⇒ содержит 0.03 % ProClin 300+0.01 % гентамицина сульфата

***⇒ содержит 0.03 % ProClin 300+0.015 % 5-бromo-5-нитро-1,3-диоксан (BND) + 0.010 % 2-метил-2Н-изотиазол-3-один (MIT).

4.1.1 Необходимые но не поставляемые материалы

1. Микротитровальный планшетный калибровочный ридер (450/620нм +/- 10нм).
2. Калибровочные микропипетки разного объема.
3. Инкубатор на 37°C.
4. Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
5. Воротковый трубчатый миксер.
6. Таймер.
7. Абсорбирующая бумага.

4.2 Хранение и стабильность набора

Реагенты стабильны до даты срока годности, указанной на этикетке при хранении при 2 - 8 °С.

Не использовать реагенты после окончания срока годности!

4.3 Подготовка реагентов

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

Промывочный раствор

Развести промывочный раствор 1+19 (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий редистилированной водой. потребление: ~5 мл на определение

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °С на водяной бане.

стабильность после разведения: 4 недели при 2 ÷ 8 °С

5. Образцы

В данном исследовании может использоваться сыворотка.

Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

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

5.2 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.

5.3 Разведение образцов

Развести каждый образец пациента 1+100 раствором для разведения образцов, напр., 10 мкл образца + 1 мл раствора для разведения, хорошо смешать, оставить на 15 минут снова легко перемешать.

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

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

Внимательно прочитайте инструкцию перед выполнением анализа. Надежность результатов зависит от четкого следования инструкциям.

- **Перед использованием все реагенты довести до комнатной температуры.** Реагенты необходимо смешать без образования пены.

- Рекомендуется проводить процедуру непрерывно.

- Избегать контаминации реагентов, пипеток, и лунок/пробирок. Используйте новые одноразовые пластиковые наконечники для каждого реагента или образца.

- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, извлечь крышки, установить лунки в держатель и т.д. Это обеспечит непрерывное проведение каждого шага пипетирования.

- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

Перед проведением анализа необходимо составить схему распределения и идентификации образцов и контролей с помощью формы вложенной в набор.

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 дублях.

Этап 1

а) Раскапать:

100 мкл **готового к употреблению** отрицательного контроля в лунку B1,
100 мкл **готового к употреблению** "cut-off" контроля в лунки C1+D1,
100 мкл **готового к употреблению** 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! Накрывать лунки пленкой поставляемой в наборе.

б) Инкубировать: **1 час при 37 °C.**

Во время инкубации подготовить требуемое кол-во промывочного раствора достаточное для количества используемых лунок. (см. «Подготовка реагентов»).

в) Удалить содержимое лунок и промыть их **5 раз** 300 мкл рабочего промывочного раствора.

Примечание:

Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.

В конце осторожно удалить остатки жидкости выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!

Этап 2

а) Раскапать: **100 мкл** готового к употреблению конъюгата антител IgA к *Chlamydia trachomatis* во все лунки **кроме A1** и накрыть их пленкой.

б) Инкубировать: **30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °C)**. Не подвергать воздействию прямого солнечного света!

в) Повторить процедуру промывки как описано в этапе 1).

Примечание: *осторожно удалить остатки жидкости выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!*

Этап 3

а) Раскапать: **100 мкл** готового к употреблению раствора ТМБ **во все** лунки и опять их накрыть.

б) Инкубировать: **ровно 15 минут при комнатной температуре (20 ± 25 °C) в темноте.**

в) Раскапать: **100 мкл** стоп-раствора (как и ТМБ) **во все** лунки.

Любое голубое окрашивание проявившееся во время инкубации переходит в желтое.

Примечание: *высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!*

6.3 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 в течении 30 минут** после добавления Стоп Раствора и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в схему.

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

7. РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1 Надежность процесса анализа

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

- **Бланк субстрата в A1**: ⇒ значение абсорбции менее **0.100**.
- **Отриц. контроль в C1**: ⇒ значение абсорбции менее **0.200**.
- **Cut-off контроль (CO) в C1/D1**: ⇒ значение абсорбции между **0.250-0,600**.
- **Положит. контроль in E1**: ⇒ значение абсорбции более **0,600**.

7.2 Вычисление

Среднее значение абсорбции "Cut-off" контроля [CO]

Рассчитать среднее значение абсорбции 2 определенных негативных контролей (напр., в C1/D1).

Пример: (0.44 + 0.46) ÷ 2 = 0.45 = CO

7.3 Интерпретация

Средние значения абсорбции образцов пациента более чем на **10 % больше 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 на **10 % ниже CO**
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

7.3.1 Результаты в DRG единицах [DU]

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

1.580 x 10

Пример: ————— = 35 DU

0.45

Интерпретация результатов

Значение Cut-off: 10 DU

Серая зона: 9 - 11 DU

Отрицательный: < 9 DU

Положительный: > 11 DU

8. 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.

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.

10. Важное замечание для интерпретации результатов

Так как типы ВПГ 1 и 2 имеют очень сходные серотипы они показывают высокую степень кросс реакции.

Поэтому инфицирование одним серотипом ВПГ вызывает увеличение кол-ва антител другого, гетерологичного серотипа.

По этой причине положительный результат на ВПГ 2 IgG сам по себе не является точным определением инфекции ВПГ-1!

Для определения серотипа вируса, которым был инфицирован пациент, образцы пациентов **должны исследоваться параллельно** используя наборы для детекции ВПГ типа 1 и типа 2.

Более высокая концентрация антител указывает на доминирующие антитела и определяет соответствующий серотип ВПГ.

11. ЮРИДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Тест должен проводиться согласно инструкции производителя. Более того, потребитель должен точно соблюдать все правила. В процессе проведения анализа важно включать достаточное количество контролей для оценки точности теста. Результаты теста действительны, только если они отвечают нормам и если все параметры теста отвечают спецификации теста.

11.2 Терапевтическое заключение

Терапевтическое заключение не должно базироваться только на результатах лабораторных исследований, даже если они считаются достоверными. Любой результат является только частью общей клинической картины пациента.

Диагностика инфекционного заболевания не может устанавливаться только на основе единственного результата теста. Точная диагностика должна учитывать всю клиническую картину пациента (историю, симптомы, сывороточные данные). Только в случаях, когда лабораторные результаты совпадают с нормами и общей картиной пациента, можно делать терапевтическое заключение.

Только результаты этого теста не могут быть основой для терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора и/или замена или компонентов разных лотов с одного набора или с другого может негативно влиять на результаты и весь тест. Такая замена не может быть основой для претензий или просьбы о замене набора.

Претензии в случаях неправильного использования набора лабораторией тоже не могут являться действительными. В обязанность производителя не входит замена или возвращение стоимости набора при невнимательном его использовании или неправильном транспортировании.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»

ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005

Тел.: (0342) 775122

Факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.com

www.diameb.com