

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgG ДО ВІРУСУ ПРОСТОГО ГЕРПЕСУ 2 ТИПУ

HSV2 IgG

Кат. №: **HSV2G.CE**

Дата випуску інструкції: **11-2019**
Версія: **6**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпасти.

Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного/якісного визначення антитіл IgG до Вірусу Простого Герпесу 2 типу у сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного/якісного визначення антитіл IgG до Вірусу Простого Герпесу типу 2 у плазмі та сироватці людини.

Тільки для діагностики *in vitro*.

В. ВСТУП

Вірус Простого Герпесу типу 1 (HSV1) і типу 2 (HSV2) є великими складними ДНК-вмісними вірусами, які, як було показано, індукують синтез кількох білків під час інфекції, мають велику кількість перересних детермінант і лише кілька типоспецифічних послідовностей.

Більшість первинних і рецидивних генітальних герпетичних інфекцій спричинені HSV2; в той час як не генітальні інфекції, такі як герпес, викликані переважно HSV1.

Виявлення специфічних до вірусу антитіл IgG та IgM має важливе значення для діагностики гострих/первинних вірусних інфекцій або реактивації прихованої інфекції за відсутності явних клінічних симптомів. Безсимптомні інфекції можуть виникати при HSV у начебто здорових осіб та під час вагітності. Важкі герпетичні інфекції можуть виникнути у пацієнтів з ослабленим імунітетом і пригніченим імунітетом, у яких хвороба може перерости в критичні патології.

Визначення специфічних антитіл до HSV стало важливим для моніторингу пацієнтів із «ризиком» та для спостереження за гострими та важкими інфекціями.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті синтетичним HSV2-специфічним глікопротеїном G або gG.

Тверду фазу спочатку обробляють розведеним зразком, а IgG до HSV2 захоплюються антигенами, якщо вони присутні.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка під час 2-ї інкубації виявляються зв'язані анти-HSV2 IgG шляхом додавання поліклональних специфічних антитіл анти-HlgG, мічених пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості антитіл анти-HSV2 IgG, присутніх у зразку. Калібрувальна крива, відкалібрована за внутрішнім Золотим стандартом, робить можливим кількісне визначення антитіл IgG у пацієнта.

Д. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатню кількість реагентів для виконання 96 тестів.

1. Мікропланшет: MICROPLATE

x1. 12 смужок x 8 мікролунок, покритих синтетичним HSV2-специфічним gG у присутності білків великої рогатої худоби. Пластини запечатані в пакет з осушувачем. Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітись до кімнатної температури; повторно запечатайте невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігайте при 2.8° C (°C).

2. Калібрувальна крива: CAL №...

Готова до використання та кодована кольорами стандартна крива отримана з позитивної на HSV2 IgG плазми людини у діапазоні:
4 мл (мл) CAL1 = 0 дов.Од/мл (arbU/ml)
4 мл (мл) CAL2 = 5 дов.Од/мл (arbU/ml)

2 мл (мл) CAL3 = 10 дов.Од/мл (arbU/ml)
2 мл (мл) CAL4 = 20 дов.Од/мл (arbU/ml)
2 мл (мл) CAL5 = 50 дов.Од/мл (arbU/ml)
4 мл (мл) CAL6 = 100 дов.Од/мл (arbU/ml).

Стандарти відкалібровані за внутрішнім золотим стандартом або IGS в довільних одиницях.

Містить білки сироватки людини, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Стандарти мають синій колір.

3. Контрольна сироватка: CONTROL ... мл (ml)

1 флакон. Ліофілізована. Містить білки фетальної сироватки великої рогатої худоби, антитіла IgG людини до HSV2 у концентрації приблизно 20 дов.Од/мл (arbU/ml) ± 20%, 0.2 мг/мл (mg/ml) сульфату гентаміцину та 0.045% ProClin 300 як консерванти.

Примітка: Об'єм, необхідний для розчинення вмісту флакона, може відрізнятися від партії до партії. Будь ласка, використовуйте правильний об'єм, зазначений на етикетці.

4. Концентрат промивного буфера: WASHBUF 20X

1x60 мл/пляшка (ml/bottle) 20X концентрований розчин.

Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатний буфер, pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% Tween 20 та 0.045% ProClin 300.

5. Ферментний кон'югат: CONJ

2x8 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання, кодований червоним кольором. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому поліклональні антитіла до IgG людини, 5% BSA, 10 мМ (mM) Tris-буфер pH 6.8 +/- 0.1, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцин сульфат як консерванти і 0.01% червоного харчового барвника.

6. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл/флакон (ml/vial). Він містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатний буфер, pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксиду, 0.03% тетраметил-бензидину (або TMB) та 0.02% перекису водню (H₂O₂).

Примітка: Зберігати захищеним від світла через чутливість до сильного освітлення.

7. Сірчана кислота: H₂SO₄ 0.3 M (M)

1x15 мл/флакон (ml/vial). Містить розчин 0.3 M (M) H₂SO₄.

Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

8. Розчинник для зразків: DILSPE

2x60 мл/флакон (ml/vial). Містить 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Реагент кодується синім кольором.

9. Уцільнювальна фольга для планшета x 2 шт.

10. Вкладиш інструкції x 1 шт.

Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (1000 мкл (µl), 100 мкл (µl) і 10 мкл (µl)) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу EIA (бідистильована або деіонізована, деревне вугілля, оброблене для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
3. Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
4. Абсорбуючі паперові серветки.
5. Відкалібрований термостатичний інкубатор для мікропланшетів ІФА (сухий або вологий), встановлений на +37 °C (°C) (допуск +/-0.5 °C (°C)).
6. Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
7. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
8. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або

- ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
3. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
 4. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Не надавайте Хромоген (ТМВ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
 5. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
 6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
 7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
 8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
 9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
 10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказало на будь-яку відповідну втрату активності до 6 повторних використань пристрою протягом 3 місяців.
 11. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікації Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
 12. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
 13. Відходи, що утворились під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв.
 14. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
 15. Сірчана кислота є подразнюючою. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
 16. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

G. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
3. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних

результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важкі частинки або мікробні нитки та тіла, слід викинути, оскільки вони можуть привести до помилкових результатів.

4. Сироватку та плазму можна зберігати при + 2-8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно вибрані з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) протягом декількох місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
5. Якщо є частинки, центрифугувати при 2000 об/хв (rpm) протягом 20 хвилин або фільтрувати за допомогою фільтрів 0.2-0.8 мкм (µ), щоб очистити зразок для тестування.

Н. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказало на істотну втрату активності до 6 повторних використання пристрою та терміном до 3 місяців.

Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету досягти кімнатної температури (близько 1 години). Переконайтеся, що осушувач не набув темно-зеленого забарвлення, що вказує на дефект виробництва. У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів Dia.Pro. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий пакет, разом з осушувачем, щільно закрити і зберігати при + 2-8 °C (°C). При першому відкритті смужки, що залишились, є стабільними, поки показник вологості всередині мішка з осушувачем не змінює колір з жовтого на зелений.

Калібрувальна крива:

Готовий до використання компонент. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

Контрольна сироватка:

Додайте до ліофілізованого порошку об'єм води класу ІФА, зазначений на етикетці; дайте повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі.

Примітка: Контроль після розчинення не стабільний. Зберігати замороженим у вигляді аліквот при -20 °C (°C).

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням увесь вміст концентрованого розчину слід розбавити 20X бідистильованою водою і обережно перемішати обертанням з денця на кришку. Під час приготування уникайте піноутворення, оскільки наявність бульбашок може спричинити погану ефективність промивання.

Примітка: Після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при + 2..8 °C (°C).

Ферментний кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Уникайте забруднення рідини окислювальними хімікатами, пилом або мікробами.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикові стерильні одноразові контейнери.

Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Не надавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову, доступну стерильну одноразову тару.

Розчинник зразка:

Готовий до використання компонент. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

Сірчана кислота:

Готова до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Увага: Подразнююча речовина (H315, H319, P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Легенда:

Попереджувальні **H-фрази**:

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні **P-фрази**:

P280 - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

P302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

P332+P313 - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P305+P351+P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

P337+P313 - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P362+P363 - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

I. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та достовірність +/- 2%. Також слід регулярно проводити дезактивацію розливів або залишків компонентів набору.
2. Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубації підходять як сухі інкубатори, так і водняні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА.
3. **Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очищати від солей деіонізованою водою. Перед використанням вошер слід інтенсивно праймувати розведеним Промивним Розчином. Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 М (М) NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку (μl/well) промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками. Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилково позитивних реакцій.
4. Час інкубації має допуск +/- 5%.
5. Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (a) пропускну здатність ≤ 10 нм (nm); (b) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (c) лінійність до ≥ 2.0; (d) повторюваність ≥ 1%. Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.
6. При використанні автоматизованої робочої станції ІФА всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані, контрольовані та регулярно обслуговуватися, щоб відповідати значенням, наведеним у розділі «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для обробки рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена, приділяючи особливу увагу, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для видачі зразків та промивання. Ефект перенесення повинен бути вивчений і контрольований, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекомендується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за пробіг.

7. Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком.
3. Переконайтеся, що Хромоген (ТМВ) безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи його невеликий об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.
4. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролило рідини всередині коробки (основний контейнер). Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
5. Розчиніть вміст ліофілізованої Контрольної Сироватки, як повідомлялося.
6. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
7. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім обережно перемішайте на вортексі всі рідкі реагенти.
8. Встановіть інкубатор ІФА на +37 °C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивки, як повідомляється в конкретному розділі.
9. Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
10. Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
11. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
12. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
13. У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче, з обережністю, щоб підтримувати однаковий час інкубації для всіх зразків під час тестування.

Набір можна використовувати для кількісних і якісних визначень.

M1. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ:

Автоматичний аналіз:

Якщо тест виконується автоматично за допомогою системи ІФА, ми пропонуємо налаштувати прилад на аспірацію 1000 мкл (μl) Розчинника зразка, а потім 10 мкл (μl) зразка (коефіцієнт розведення 1:101). Весь вміст потім внести у правильно визначену пробірку для розведення. Перед аспірацією наступного зразка голки необхідно належним чином промити, щоб уникнути перехресного забруднення між зразками. Коли всі зразки будуть розведені, налаштуйте прилад на аспірацію 100 мкл (μl) зразків у відповідні лунки мікропланшета.

Цю процедуру можна проводити також у два етапи розведень 1:10 кожне (90 мкл (μl) Розчинника зразка + 10 мкл (μl) Зразка) у другу платформу для розведення. Потім налаштуйте прилад на аспірацію спочатку 100 мкл (μl) Розчинника зразка, потім 10 мкл (μl) рідини з першого розведення на платформі і, нарешті, дозувати весь вміст у відповідну лунку мікропланшета для аналізу.

Не розбавляйте Калібратори та розчинену Контрольну Сироватку, оскільки вони готові до використання.

Внесіть 100 мкл (μl) Калібраторів/Контролю у відповідні калібрувальні/контрольні лунки.

Для наступних операцій дотримуйтеся інструкцій, наведених нижче для ручного аналізу.

Настійно рекомендується переконатися, що проміжок часу між подачею першої та останньої проби буде розраховано приладом і враховано, відповідно відстрочивши першу операцію промивання.

Ручний аналіз:

1. Розведіть зразки 1:101 у правильно позначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (µl) Розчинника зразка + 10 мкл (µl) зразка). Не розбавляйте набір для Калібрування, оскільки калібратори готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
2. Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Залиште лунки А1 та В1 порожніми для операції бланкування.
3. Внесіть 100 мкл (µl) Калібраторів та 100 мкл (µl) Контрольної Сироватки в двох примірниках. Потім внесіть 100 мкл (µl) розведених зразків у кожну правильно ідентифіковану лунку.
4. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при + 37 °С (°C)**.

Важливе зауваження: Смужки повинні бути заклені клейкою ущільнювальною фольгою, що постачається з набором, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

5. Промийте мікропланшет з використанням автоматичного вошера, як описано раніше (розділ І.3).
6. Піпетуйте 100 мкл (µl) Ферментного Кон'югату в кожну лунку, окрім лунок А1+В1 для бланкування і закрийте плівкою. Перевірте, чи цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, окрім лунок А1 та В1.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, наповненим Ферментним кон'югатом. Може відбутися забруднення.

7. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при +37 °С (°C)**.
8. Промийте мікролунок, як описано в кроці 5.
9. У кожну лунку внесіть піпеткою 100 мкл (µl) суміші Хромоген/Субстрат, включаючи лунки А1 та В1 для бланкування. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі (18-24 °С (°C)) протягом 20 хвилин**.

Важливе зауваження: Не піддавайте сильному прямому освітленню. Можливо, буде створено високий фон.

10. Піпетуйте 100 мкл (µl) Сірчаної кислоти, щоб зупинити ферментативну реакцію, у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 9. Додавання кислоти змінить позитивні калібратори, контрольну сироватку та позитивні зразки з синього на жовтий.
11. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, використовуючи 450 нм (nm) фільтр (зчитування) та 620-630 нм (nm) фільтр (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи прилад на А1 або В1 чи на обох.

М2. ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ:

Якщо потрібне лише якісне визначення, дійте, як описано нижче:

Автоматичний аналіз:

Дійте, як описано в розділі М1.

Ручний аналіз:

1. Розведіть зразки 1:101 у правильно позначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (µl) Розчинника зразка + 10 мкл (µl) зразка). Не розбавляйте набір для Калібрування, оскільки калібратори готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
2. Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Залиште лунку А1 порожньою для операції бланкування.
3. Внесіть 100 мкл (µl) Калібратора 0 дов.Од/мл (arBU/ml) і Калібратора 5 дов.Од/мл (arBU/ml) в дублях та Калібратора 100 дов.Од/мл (arBU/ml) в одному примірнику. Потім внесіть 100 мкл (µl) розведених зразків у кожну правильно ідентифіковану лунку.
4. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при + 37 °С (°C)**.

Важливе зауваження: Смужки повинні бути заклені клейкою ущільнювальною фольгою, що постачається з набором, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

5. Промийте мікропланшет з використанням автоматичного вошера, як описано раніше (розділ І.3).

6. Піпетуйте 100 мкл (µl) Ферментного Кон'югату в кожну лунку, окрім лунки А1 і закрийте плівкою. Перевірте, чи цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, окрім лунки А1.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, наповненим Ферментним кон'югатом. Може відбутися забруднення.

7. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при +37 °С (°C)**.
8. Промийте мікролунок, як описано в кроці 5.
9. У кожну лунку внесіть піпеткою 100 мкл (µl) суміші Хромоген/Субстрат, включаючи лунку для бланкування. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі (18-24 °С (°C)) протягом 20 хвилин**.

Важливе зауваження: Не піддавайте сильному прямому освітленню. Можливо, буде створено високий фон.

10. Піпетуйте 100 мкл (µl) Сірчаної кислоти, щоб зупинити ферментативну реакцію, у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 9. Додавання кислоти змінить позитивні калібратори, контрольну сироватку та позитивні зразки з синього на жовтий.
11. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, використовуючи 450 нм (nm) фільтр (зчитування) та 620-630 нм (nm) фільтр (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи прилад на А1.

Важливі загальні зауваження:

1. Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
2. Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.

Н. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Калібратори та Контроль(*)	100 мкл (µl)
Зразки розведені 1:101	100 мкл (µl)
1-а інкубація	60 хвилин
Температура	+37 °С (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (µl)
2-а інкубація	60 хвилин
Температура	+37 °С (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМВ/Н ₂ О ₂	100 мкл (µl)
3-я інкубація	20 хвилин
Температура	кімнатна
Сірчана кислота	100 мкл (µl)
Зчитування ОЦ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

(*) Важливі примітки:

- Контрольна Сироватка (CS) не впливає на підрахунок результатів тесту.
- Контрольна Сироватка (CS) використовується лише в тому випадку, якщо керівництво вимагає внутрішнього контролю якості лабораторії.

Нижче наведено приклад схеми розподілу для Кількісного аналізу:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S 1										
B	BLK	CAL4	S 2										
C	CAL1	CAL5	S 3										
D	CAL1	CAL5	S 4										
E	CAL2	CAL6	S 5										
F	CAL2	CAL6	S 6										
G	CAL3	CS (*)	S 7										
H	CAL3	CS (*)	S 8										

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратор S = Зразок
CS (*) = Контрольна Сироватка - не обов'язково

Нижче наведено приклад схеми розподілу в Якісних аналізах:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 3	S 11										
B	CAL1	S 4	S 12										
C	CAL1	S 5	S 13										
D	CAL2	S 6	S 14										
E	CAL2	S 7	S 15										
F	CAL6	S 8	S 16										
G	S1	S 9	S 17										
H	S2	S 10	S 18										

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратори S = Зразок

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації проводиться на калібраторах кожного разу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результати аналізу є відповідними.

Переконайтесь, що досягнуто наступних результатів:

Параметр	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.050 значення OD450 нм (nm)
CAL1 0 дов.Од/мл (arbU/ml)	< 0.150 середнього значення OD450 нм (nm) після бланкування коефіцієнт варіації < 30%
CAL2 5 дов.Од/мл (arbU/ml)	OD450 нм (nm) \geq OD450 нм (nm) CAL1 + 0.100
CAL6 100 дов.Од/мл (arbU/ml)	OD450 нм (nm) \geq 1.000

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі і виконайте такі перевірки:

Проблема	Перевірити
Бланк-лунка OD450 нм (nm) > 0.050	1. чи розчин Хромоген/Субстрат не був забруднений під час аналізу
CAL1 0 дов.Од/мл (arbU/ml) > 0.150 OD450 нм (nm) після бланкування коефіцієнт варіації > 30%	1. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в рамках попереднього кваліфікаційного дослідження; 2. чи використовується відповідний м'який розчин, а перед використанням вошер був ним праймований; 3. чи в процедурі аналізу не було допущено помилки (внесення позитивного калібратора замість негативного); 4. чи не відбулось забруднення негативного контролю або лунок, де розподіл був здійснений, через розливання позитивних зразків або ферментного кон'югату; 5. чи мікропіпетки не забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом; 6. чи голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.
CAL2 5 дов.Од/мл (arbU/ml) OD450 нм (nm) \leq OD450 нм (nm) CAL1 + 0.100	1. чи процедура була правильно виконана; 2. чи під час внесення контролю не сталася помилка (внесення неправильного калібратора); 3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. чи не відбулося зовнішнього забруднення калібратора.
CAL6 100 дов.Од/мл (arbU/ml)	1. чи процедура була правильно виконана;

≤ 1.000 OD450 нм (nm)	2. чи під час внесення контролю не сталася помилка (внесення неправильного калібратора); 3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. чи не відбулося зовнішнього забруднення позитивного контролю.
----------------------------	---

Якщо виникла якась із вищезазначених проблем після перевірки, повідомте про цю проблему керівнику для подальших дій.

** Примітка:

Якщо використовувалася Контрольна Сироватка, перевірте такі дані:

Проблема	Перевірити
Контрольна Сироватка	Середнє значення OD450 нм (nm) CAL 4 \pm 20%

Якщо результати тесту не відповідають наведеним вище вимогам, дійте наступним чином:

Проблема	Перевірити
Контрольна Сироватка Відрізняється від очікуваного значення	1. чи процедура була правильно виконана; 2. чи під час внесення не сталася помилка (внесення неправильного калібратора); 3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. чи не відбулося зовнішнього забруднення контролю.

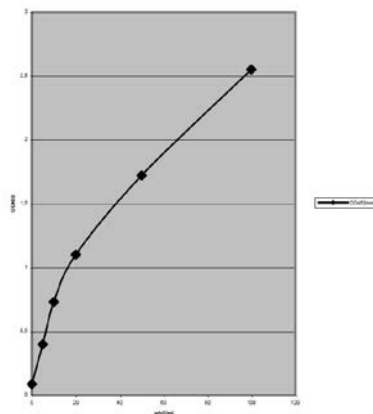
У будь-якому випадку, якщо всі інші параметри (Бланк, CAL1, CAL2, CAL6) відповідають встановленим вимогам, тест можна вважати дійсним.

Р. РЕЗУЛЬТАТИ

Р.1 Кількісний метод

Якщо тест виявиться дійсним, використовуйте для кількісного методу затверджену програму побудови кривої, щоб накреслити калібрувальну криву зі значень, отриманих при зчитуванні при 450 нм (nm) (пропонується інтерполяція з 4 параметрами). Потім за калібрувальною кривою розрахуйте концентрацію антитіл анти-HSV2 IgG у зразках.

Нижче наведено приклад калібрувальної кривої.



Важлива примітка:

Не використовуйте наведену вище калібрувальну криву для розрахунків.

Р.2 Якісний метод

У якісному методі розрахуйте середні значення OD450 нм (nm) для калібраторів 0 і 5 дов.Од/мл (arbU/ml), а потім перевірте, що аналіз дійсний.

Нижче наведено приклад розрахунку:

Калібратор 0 дов.Од/мл (arbU/ml): 0.020 – 0.024 OD450 нм (nm)
Середнє значення: 0.022 OD450 нм (nm)
Нижче 0.150 – Приймається

Калібратор 5 дов.Од/мл (arbU/ml): 0.350 – 0.370 OD450 нм (nm)
Середнє значення: 0.360 OD450 нм (nm)
Вищий, ніж CAL0 + 0.100 – Приймається

Калібратор 100 дов.Од/мл (arbU/ml): 2.245 OD450 нм (nm)
Більше 1.000 – Приймається

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Зразки з концентрацією нижче 5 дов.Од/мл (arbU/ml) вважаються негативними на IgG антитіла до HSV2.

Зразки з концентрацією вище 5 дов.Од/мл (arbU/ml) вважаються позитивними на IgG антитіла до HSV2.

Особливу увагу при інтерпретації результатів слід приділяти під час спостереження за вагітністю щодо первинної інфекції HSV через ризик розвитку вад новонароджених.

Важливі примітки:

1. Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
2. Коли результати випробувань передаються з лабораторії до іншого відділення, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
3. Під час спостереження вагітності позитивний результат інфекції HSV слід підтвердити (наявність антитіл IgG > 5 дов.Од/мл (arbU/ml)), щоб виключити ризик хибнопозитивного результату та хибного визначення захисту.

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Межа виявлення

Межа виявлення аналізу була розрахована за допомогою внутрішнього золотого стандарту за відсутності міжнародного препарату, на який можна було б посилатися.

Межа виявлення розрахована як середнє значення OD450 нм (nm) Калібратора 0 дов.Од/мл (arbU/ml) + 5 SD.

У таблиці нижче наведені середні значення OD450 нм (nm) цього стандарту при розведенні в негативній плазмі, а потім дослідженні в аналізі для трьох партій.

Середні значення OD450 нм (nm) (n = 2)

IgG дов.Од/мл (arbU/ml)	HSV2G.PU Лот № 1203	HSV2G.PU Лот № 1103	HSV2G Лот № 0304/2
0	0.022	0.030	0.014
5	0.353	0.384	0.269
10	0.596	0.606	0.557
20	1.169	1.471	0.895
50	2.030	2.276	1.776
100	3.102	3.353	2.893

Аналіз показує межу виявлення набагато краще, ніж 5 дов.Од/мл (arbU/ml).

2. Діагностична Чутливість

Діагностична чутливість була перевірена в дослідженні оцінки ефективності на панелях зразків, які класифікувалися як позитивні з набором, схваленим FDA США. Досліджено позитивні зразки з різних стадій HSV-інфекції. Значення, отримане при аналізі понад 300 зразків, становило ≥ 98%.

3. Діагностична специфічність

Діагностична специфічність була визначена на панелях негативних зразків від неінфікованих осіб, класифікованих як негативні за допомогою набору, схваленого FDA США.

Для визначення значення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватки.

Заморожені зразки також були перевірені на предмет інтерференцій під час збирання та зберігання.

Інтерференцій не помічено.

Були протестовані зразки, що можуть інтерферувати, отримані від пацієнтів з різними патологіями (переважно ANA, AMA та RF позитивні) та від вагітних жінок.

Перехресної реакції не спостерігалось.

Загальне значення > 98% специфічності було виявлено при дослідженні більш ніж 100 зразків.

3. Точність

Було розраховано на Калібраторі 5 дов.Од/мл (arbU/ml), що вважається граничним значенням аналізу, дослідженого в 16 повторях у трьох окремих циклах для трьох партій.

Результати повідомляються таким чином:

HSV2G.CE Лот № 1004

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Отримане середнє
OD 450 нм (nm)	0.286	0.303	0.256	0.282
Стандартне відхилення	0.022	0.037	0.020	0.026
CV%	7.7	12.4	7.74	9.28

HSV2G.PU Лот № 1103

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Отримане середнє
OD 450 нм (nm)	0.375	0.384	0.394	0.384
Стандартне відхилення	0.019	0.022	0.015	0.019
CV%	5.07	5.73	3.81	4.87

HSV2G.PU Лот № 1203

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Отримане середнє
OD 450 нм (nm)	0.352	0.345	0.332	0.343
Стандартне відхилення	0.017	0.020	0.024	0.020
CV%	4.83	5.78	7.23	5.95

Змінність, показана в таблицях вище, не призвела до неправильної класифікації зразків.

S. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Бактеріальне забруднення або теплова інактивація зразка може вплинути на значення поглинання зразків з подальшою зміною рівня аналізу.

Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати після відтавання, можуть давати деякі помилкові результати.

Цей тест підходить лише для тестування окремих зразків, а не пулованих. Діагноз інфекційного захворювання не слід встановлювати на підставі одного результату дослідження. Необхідно враховувати клінічний анамнез пацієнта, його симптоматику, а також інші діагностичні дані.

ЛІТЕРАТУРА

1. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunochemistry 8: 871-874, 1971.
2. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol.. 109: 129-135, 1971.
3. Remington J.S. and Klein J.O.. (1996) In "Infectious diseases of fetus and newborn infant". Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
4. Volk W.A. (1982) In "essential of Medical Microbiology". 2nd ed., pp 729, G.B. Lippincott Co. Philadelphia, New York, S.Josè, Toronto.
5. Leinikki P.O. et al.. J.Clin.Microbiol.. 8:418, 1978.
6. Piroid E. et al.. Révue Méd.Vet.. 131:25, 1980.
7. Vaheri A. et al.. J.Med.Virol.. 5:171, 1980.
8. Vejtorp M. et al.. Acta Path.Microbiol.Scand.. 88:349, 1980.
9. Voller A. et al.. Brit.J.Exp.Pathol.. 56:338, 1975.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила EN ISO 13485. Кожна партія піддається контролю якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК

DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy
Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it

ТОВ ДІА.ПРО

Діагностік Біопробс s.r.l.
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан (МІ) Італія
тел.: +39 02 2700 7161
факс: +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

