



**Набор ИФА  
для полуколичественного и качественного  
определения в сыворотке или плазме антител  
класса IgM к вирусу простого герпеса 1+2 типа  
(ВПГ 1+2)**

**Каталог. №** : HSV3022M

**Количество** : 96

**Производитель:** Orgenium Laboratories (Финляндия)

*Методика от 24-09-2009*

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

**ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ**

Набор Orgenium Laboratories' Herpes Simplex Virus Types 1+2 (HSV 1+2) IgM Antibody EIA Test разработан для полуколичественного и качественного определения специфических антител класса IgM в сыворотке или плазме к ВПГ-1 и ВПГ-2.

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

**Окончательный диагноз должен быть поставлен квалифицированным врачом в контексте клинической истории пациента в сочетании с другими подтверждающими диагностическими методами при их применении.**

**ПРИНЦИП АНАЛИЗА**

Настоящее исследование основано на принципе иммуоферментных анализов (ИФА). Очищенный антиген наносится на поверхность лунок микротитрационного планшета. Разбавленные образцы и контроли капают из пипетки в лунки микротитрационного планшета. Происходит закрепление между антителами класса IgM (или ЦСЖ) и иммобилизованным антигеном. После 30-минутной инкубации при 37°C планшет промывается разбавленным промывочным раствором, чтобы удалить несвязанный материал. Впоследствии, конъюгат пероксидазы анти-человеческого IgM добавляется и инкубируется в течение 30 минут при 37°C. После дальнейшей промывки раствора субстрата (ТМБ) капается из пипетки и инкубируется в течение 15 минут при 37°C, стимулируя развитие синего цвета в лунках. Развитие цвета прекращается добавлением стоп-раствора, который изменяет цвет от синего до желтого. Получившийся окрас измеряется спектрофотометрическим способом при длине волны 450 нм.

Общее время инкубации: **75 минут.**

**КОМПОНЕНТЫ НАБОРА**

**1. Микронуночный планшет**, 1 шт. : 12x8 лунок

Микротитрационные стрипы, помеченные определенным цветом и кодом, каждая состоящая из 8 лунок, покрытых смесью очищенного антигена ВПГ-1 и ВПГ-2.

*Цветовые и текстовые коды на стрипе указывают на исследуемый патоген.*

**2. Отрицательный контроль**, 1 флакон

Готовый к использованию.

**3. Положительный контроль**, 1 флакон

Готовый к использованию.

**4. Ферментный конъюгат\*\***, 15 мл

Антитела к человеческому IgM, конъюгированные пероксидазой хрена, синего цвета. Готовый к использованию.

**5. Раствор субстрата ТМБ**, 8 мл

Содержит раствор 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Готовый к использованию; потенциально опасен при контакте с кожей; раздражает глаза.

**6. Стоп-раствор ТМБ**, 8 мл

Содержит раствор 2 N серной кислоты (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Готовый к использованию; избегать контакта со стоп-раствором; он может вызвать раздражения кожи и ожоги.

**7. Разбавитель образцов\*\*\***, 120 мл

Содержит порцию стабилизированного неэстерифицированного холестерина со специфическими IgG-антителами в качестве ингибитора. Готовый к использованию.

**8. Промывочный буфер – концентрат**, 50 мл

20x концентрированный

После разбавления проверить pH разбавленного промывочного буфера и при необходимости довести его pH до 7,4.

**9. Крышка планшета**, 1 шт.

Крышка для накрывания микротитрационных стрипов во время инкубации.

**СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ**

- Все компоненты набора, кроме 20x концентрированного промывочного буфера, должны храниться при 2-8°C и использоваться до даты истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Хранить 20x концентрированный промывочный буфер при комнатной температуре. В случае образования кристаллов в буфере, просто следует нагревать реактивную бутылку до 37°C, пока кристаллы полностью не растворятся.
- Неиспользованные стрипы должны быть помещены в мешочек, содержащий осушитель и плотно закрыты перед хранением при 2-8°C. После вскрытия стрипы стабильны пока осушитель не станет розовым.
- Разбавленный промывочный раствор может храниться в течение 1 недели при комнатной температуре или 3 недели при 2-8°C.
- Готовый к использованию фермент, конъюгированный античеловеческими антителами, стабилен по крайней мере 1 месяц после вскрытия бутылки. Предотвращать от загрязнения. Не возвращать неиспользованную часть человеческого раствора антител обратно в бутылку с исходным раствором.
- Все другие жидкие реагенты стабильны если хранить при 2-8°C, при условии, что с ними обращаются внимательно во избежание любого загрязнения окружающей среды. Прежде, чем их выбросить или обработать в автоклаве, они должны рассматриваться как потенциально инфекционные.

**ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ**

- Должны использоваться образцы сыворотки или плазмы (ЭДТА, гепарин); соблюдать обычные предосторожности при венепункции. Образец может храниться при 2-8°C до 48 часов, но должен быть заморожен до -20°C или ниже в течение более длительного хранения.
- Необходимо избегать повторного замораживания/размораживания.
- Размороженные образцы должны быть перевернуты несколько раз перед исследованием.
- Не использовать чрезвычайно гемолизированные или липемические образцы.

**ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ОПСТАВЛЯЕМЫЕ В НАБОРЕ МАТЕРИАЛЫ:**

- Таймер
- Вихревой смеситель (вортекс)
- Пробирки для разбавления образцов на 2 или 4 мл
- Дозаторы (3, 20, 50, 100, 500 мкл и 1 мл) и многоканальные дозаторы (400 мкл)
- Одноразовые наконечники
- Инкубатор, способный к поддержанию 37°C
- Дистиллированная вода высокого качества
- Мерные колбы для подготовки промывочного раствора
- Магнитная мешалка и дополнительная стойка для подготовки промывочного буфера
- Резервуары реагентов для многоканальных дозаторов
- Бумажные полотенца или промокательная бумага
- Микротитрационный ИФА-ридер, способный измерять абсорбцию при 450 нм.
- Микротитрационный планшет-вошер (выборочно).

**ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ**

Всем реагентам, образцам и контролям нужно позволить достичь комнатной температуры перед использованием.

**1. Образцы сыворотки и плазмы**

**Перемешать вихревым смесителем и разбавить образцы сыворотки 1:101** готовым к использованию разбавителем образца (например, 10 мкл образца + 1 мл разбавителя образца).

**10 мкл сыворотки + 1 мл разбавителя образца**

## 2. Промывочный буфер

**Хорошо перемешать и разбавить** концентрат промывочного буфера дистиллированной водой 1:20 (например, 50 мл концентрата + 950 мл дистиллированной воды). Если во время хранения в холодном месте образуется осадок кристаллов, концентрат нужно нагревать до 37°C в течение 15 минут. Проверить pH разбавленного промывочного буфера и если необходимо сбалансировать его pH на уровне 7.4. Промывочный буфер стабилен 1 месяц при 2-8°C или в течение 1 недели при комнатной температуре.

**50 мл концентрата промывочного буфера + 950 мл дистил. воды**

### ВАЖНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- По крайней мере за 1 час до использования привести все реагенты, набор калибраторов и образцы к комнатной температуре (18-30°C), тщательно их перемешивая вихревым смесителем.
- Рекомендуется использовать контрольные образцы согласно государственным нормам. Рекомендуется использование контрольных сывороток или плазмы, чтобы обеспечить проверку правильности относительно результатов. Использовать контроли и на нормальных и патологических уровнях.
- Периоды распределения и инкубации должны быть одинаковыми для всех лунок в том же анализе. При ручном проведении анализа использовать многоканальный дозатор.
- Как только анализ начат, все этапы должны быть завершены без прерывания. Используйте новые одноразовые пластмассовые наконечники дозатора для каждого реагента.
- Не позволять реакционным лункам высыхать в течение процедуры анализа. Это может вызвать высокие фоновые помехи в лунках бланка и ошибочные результаты.
- Если Вы не готовы к следующему этапу, или если процедура анализа неожиданно прервана, просто оставьте лунки в промывочном буфере. Однако, не более чем на 5 минут.

### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Подготовить образцы и реагенты как описано выше.
- Определить требуемое количество 8-луночных стрипов. Настоятельно рекомендуется анализировать каждый образец и контроль в дубле. Каждый стрип

#### Рекомендуемое размещение контролей:

- 2 лунки (например, А1 и В1): для бланка субстрата (100 мкл разбавителя образца)

- 2 лунки (например, А2 и В2): для отрицательного контроля (100 мкл)

- 2 лунки (например, А3 и В3): для положительного контроля (100 мкл)

Остальные лунки используются для образцов пациентов.

3. Закрепить в штативе желаемое количество микротитрационных стрипов и накрыть пленкой для планшета (поставляемой). Мы настоятельно рекомендуем что каждый образец и контроль исследовался в двойном экземпляре. Возвратить остальные стрипы в мешочки и хранить при 2-8°C.

4. Раскапать 100 мкл разбавителя образца, контролей и разбавленных образцов в соответствующие лунки стрипов.

5. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при 37°C.

6. Промывка: при ручной промывке энергично вытряхнуть жидкость, и добавить 300 мкл разбавленного промывочного буфера. Освободить лунки, вытряхнув жидкость, чтобы удалить любые ее остатки. Повторить эту процедуру, чтобы в общем количестве составило 4 промывки. По завершении последней промывки перевернуть планшет и постучать о промокательную бумагу. Перейти к ледующему этапу без задержки и прерывания.

При автоматической промывке произвести аспирацию всех лунок и промыть 4 раза 300 мкл разбавленного промывочного буфера. Постучать планшетом о промокательную бумагу. Перейти к ледующему этапу без задержки и прерывания.

7. Добавить последовательно по 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку.

8. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение 30 минут при 37°C.

9. Промывка: Промыть планшет следуя процедуре в этапе 6.

10. Быстро раскапать по 50 мкл раствора ТМБ в промытые лунки.

11. Накрыть микропланшет прилагаемой пленкой и инкубировать в течение 15 минут при 37°C.

12. Остановить реакцию, добавив 25 мкл стоп-раствора ТМБ в каждую лунку. Осторожно встряхнуть и считать при 450 нм в пределах 20 минут с момента добавления стоп-раствора.

### СХЕМА ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

Разбавленный образец 100 мкл	Ферментный конъюгат 100 мкл	Субстрат ТМБ 50 мкл	Стоп-раствор ТМБ 25 мкл
30 мин.	30 мин.	15 мин.	Считать планшет

Инкубации при 37°C.

### ЗНАЧЕНИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Перед началом расчета результатов убедитесь, что полученные значения для реагента бланка и контролей находятся в пределах предоставленных в Таблице 1 значений.

Таблица 1. Значения контроля качества

Образец	Ожидаемый результат
Бланк реагент	Значение абсорбции < 0.150
Отрицательный контроль	Значение абсорбции < 0.200 (Отриц. с соотнош. s/co < 0.8)
Положительный контроль	Положительный (соотнош. s/co $\geq$ 1)

Результаты считаются достоверными только если значение абсорбции бланка не превышает 0,150 и значение средней абсорбции отрицательного контроля не превышает 0,200.

### РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

#### 1. Расчет ОП порогового значения (cut-off):

**ОП Cut-off = константа Cut-off x (ОП полож. константы – ОП отриц. константы) \***

Показатель константы порогового значения см. в Сертификате контроля качества, сопровождающий этот набор. Для точной интерпретации результатов обязательно использовать правильный показатель константы порогового значения.

#### 2. Расчет соотношения s/co:

**S/CO = значение ОП образца\* - ОП отрицательного контроля / ОП порогового значения**

\*Настоятельно рекомендуется каждый контроль анализировать в дубле. Просьба использовать средние значения абсорбции каждого контроля/образца исходя их формул выше.

#### 3. Схема интерпретации результатов соотношения s/co:

Коэффициент s/co	Интерпретация
<0.80	Отрицательный
0.80-0.99	Сомнительный
>1	Положительный

#### 4. Диагностическая достоверность результатов

Таблица 2. Диагностическая достоверность и интерпретация результатов.

	Результаты IgG	Результаты IgM	Интерпретация
HSV-1+2	Отрицательный	Положительный	Первичная инфекция
	Положительный	Положительный	Первичная, или возможная реактивация инфекции
	Положительный	Отрицательный	Прошедшая инфекция
	Отрицательный	Отрицательный	No antibody detected

#### 5. Полуколичественный расчет результатов анализа

Вы можете перевести значение ОП Вашего образца в ИФАЕ (иммуоферментные единицы) следующим образом:

#### Образцы сыворотки и плазмы

**ИФАЕ = S/CO x 25**

#### 6. Интерпретация образцов острой фазы болезни и выздоравливающих

Для определения сероконверсии необходимо сравнить значения ОП спаренных образцов и рассчитать следующее:

% изменения = $\frac{\text{значение ОП 2-го образца} - \text{значение ОП 1-го образца}}{\text{значение ОП 1-го образца}} \times 100$
--

### 7. Схема интерпретации сероконверсионных результатов

% изменения в значении ОП	Интерпретация
< 50%	Отсутствие сероконверсии. Отсутствие очевидности недавней инфекции. Рекомендуется сделать забор третьего образца и анализировать параллельно с первым образцом, чтобы наблюдать за значительным увеличением показателя ОП.
≥ 50%	Сероконверсия. В показателе ОП обнаруживается значительное увеличение. Серологический признак острой инфекции (реактивация, повторная инфекция или первичная инфекция, где образец острой фазы был собран слишком поздно, чтобы продемонстрировать сероконверсию).

Значительное (т.е. ≥ 50%) увеличение абсорбции (ОП) в ИФА при 450 нм в парных сыворотках, собранных в промежутке 8-15 дней указывает на острую инфекцию.

#### ПРИМЕР РАСЧЕТА

Образец	Средняя абсорбция при 450 нм
Реагент бланка	0.050
Положительный контроль	1.378
Отрицательный контроль	0.068
Сыворотка образца	0.678

\*Пороговое значение ОП = 0,220\* (1,378-0,068) = 0.228

(Примечание: показатель константы порогового значения, указанный выше 0,220 является только примером. Правильное значение для настоящего набора указано в Сертификате контроля качества).

S/CO = 0,678 - 0.068 / 0,228 = 2,7

Значение ИФАЕ образца : 2,7 x 25 = 67 ИФАЕ

Результат образца: положительный

Значение ИФАЕ образца: 67 ИФАЕ

#### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Проводилось исследование 92 образцов сыворотки (16 ВПГ-1 IgM-положительных, 12 ВПГ-2 IgM-положительных, 64 ВПГ IgM-отрицательных).

Результаты вариации в анализе, между анализами и между сериями отрицательных, низко положительных и положительных образцов представлены ниже:

ИФА ВПГ 1+2	IgM
Точность в анализе	6 - 13 %
Точность между анализами	5 – 8 %
Точность между сериями	10 – 14 %
Перекрестная реактивность	Отсутствует к гриппу А, РСВ и ЦМВ.
Интерференции	Отсутствует относительно билирубина в концентрации до 0.3 мг/мл, гемоглобина до 8.0 мг/мл и триглицеридов до 5.0 мг/мл
*Серологическая специфичность	93 %
* Серологическая чувствительность	92,5 %
* Серологическая точность	93 %

\*\*По сравнению с другим коммерчески доступным набором ИФА IgM ВПГ1+2.

(Результаты сравнения рабочих характеристик настоящего и аналогичного наборов анализа см. в оригинале инструкции.)

#### ВНИМАНИЕ

- Отрицательный результат не исключает текущей или недавней инфекции. Если есть подозрение на острую инфекцию, второй образец сыворотки, полученный 7-14 днями позже, должен быть проверен параллельно, чтобы определить любое увеличение уровня антитела.

- Все IgM положительные серологические образцы должны исследоваться повторно, используя подтверждающий реагент. Присутствие высокого уровня IgM антител в некоторых образцах может вызвать ошибочные отрицательные результаты. Мы рекомендуем исследовать повторно образцы с высокими уровнями IgM антител, используя подтверждающий реагент компании «Ордженум» (CRCK9002M или CRDP9005M).

- Серологические результаты иммунодепрессивных пациентов должны интерпретироваться с предостережением.

- Текущие инфекции в беременных женщинах должны быть определены в сочетании этого исследования с полимеразной цепной реакцией (ПЦР) или с исследованием культуры от амниотической жидкости.

- Результаты исследований, которые получены от единственного серологического образца, не должны использоваться для диагностики недавней инфекции. Соединенные образцы (острый и выздоравливающий) должны исследоваться параллельно, чтобы наблюдать за значительным повышением уровня антител.

- Если требуются сравнения с другими методами, всегда проводят оба исследования одновременно, чтобы предотвратить неожиданные результаты.

- Результаты исследований должны быть оценены в сочетании с информацией, предоставленной клиническим обследованием и другими диагностическими процедурами.

- На эффективность работы компонентов набора не влияет транспортировка при температуре окружающей среды до 5 дней (неофициальные данные).

#### ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

#### ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Настоящий набор предназначен только для диагностического использования *in vitro* в человеческой сыворотке, плазме или образцах ЦСЖ квалифицированным и компетентным персоналом, выполняющим диагностические процедуры.

Если получатель настоящего набора передает его любым способом третьему лицу, эта инструкция, должна прилагаться, и вышеуказанный получатель должен под собственную ответственность обеспечить в пользу производителя все ограничения ответственности здесь изложенные.

Компания-производитель не несет ответственности за любые повреждения или потери из-за использования набора в любых случаях кроме тех, которые четко указаны в этой инструкции. Ответственность производителя ни в коем случае не должна превышать коммерческой ценности набора.

Производитель ни в коем случае не несет ответственности за косвенные, умышленные или наследственные повреждения, включая, но не ограничиваясь потерей прибыли.

#### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: info@diameb.ua  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)