



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

Каталог. № : HSV3024G

Количество : 96

Производитель: Orngenium Laboratories (Финляндия)

Методика от 24-09-2009

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

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор компании «Орджениум Лабораториз» **Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV 2) IgG Antibody EIA Test** разработан для **полуколичественного и качественного** определения специфических антител класса IgG в сыворотке или плазме к протеину gG2 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 иммуноферментных 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 IgG сыворотки или плазмы и иммобилизованным антигеном. После 30-минутной инкубации при 37°C планшет промывается разбавленным промывочным раствором, чтобы удалить несвязанный материал. Впоследствии, конъюгат пероксидазы анти-человеческого IgG 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 очищенным рекомбинантным белком gG2 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 IgG, 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 0,9 N серной кислоты (H₂SO₄)

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

7. Разбавитель образцов, 120 мл

Готовый к использованию.

8. Промывочный буфер – концентрат, 50 мл

20x концентрированный

9. Крышка планшета, 1 шт.

Крышка для накрывания микротитрационных стрипов во время инкубации.

СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Все компоненты набора, должны храниться при 2-8°C и использоваться до даты истечения срока годности, указанного на этикетке. 20x концентрат промывочного буфера можно также хранить при комнатной температуре, чтобы избежать кристаллизации.
- 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.
- Разбавленный промывочный раствор может храниться в течение 1 недели при комнатной температуре или месяца при 2-8°C. Если у буфера появляются признаки микробной контаминации или становится мутным, выбросите его и приготовьте новый раствор.
- Готовый к пользованию фермент, конъюгированный анти-человеческими 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 венопункции. 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± 2°C
- Дистиллированная вода высокого качества
- Мерные колбы для подготовки промывочного раствора
- 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 (18-27°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

1. **Подготовить образцы и разбавленный промывочный буфер** как описано выше.

2. **Определить требуемое количество** 8-луночных стрипов. Настоятельно рекомендуется анализировать каждый образец и контроль в дубле.

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). Возвратить остальные стрипы в мешочек и хранить при 2-8°C.

4. **Раскапать по 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:** Процедура промывки крайне важна и должна проводиться с осторожностью. Неправильная промывка может вызвать неточные результаты, такие как низкая точность и высокий фон. Промывать планшет вручную или используя автоматический планшет-вошер. 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 следующему этапу без задержки и прерывания.

При автоматический промывке произведите аспирацию всех лунок и промойте **4 раза 300 мкл разбавленного промывочного буфера**. Постучать планшетом о промокательную бумагу. Перейти к следующему 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. Инкубации при 37°C.	30 мин.	15 мин.	Считать планшет

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 ≥ 1)

*s/co – абсорбция образца/пороговое значение

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):

$$\text{ОП Cut-off} = \text{константа Cut-off} \times (\text{ОП полож. константы} - \text{ОП отриц. константы}) *$$

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:

$$S/CO = \frac{\text{значение ОП образца} * - \text{ОП отрицательного контроля}}{\text{ОП порогового значения}}$$

*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:

Кoeffициент s/co	Интерпретация
< 0.80	Отрицательный
0.80-0.99	Сомнительный
1 – 4	Положительный
> 4	Высоко положительный

4. Диагностическая достоверность результатов

Таблица 2. Диагностическая достоверность и интерпретация результатов.

	Результаты IgG	Результаты IgM	Интерпретация
HSV-2	Отрицательный	Положительный	Первичная инфекция
	*Положительный	Положительный	Первичная, или возможная реактивация инфекции
	Положительный	Отрицательный	Прошедшая инфекция
	Отрицательный	Отрицательный	Антител не обнаружено

*Высокий уровень антител IgG является серологическим признаком первичной инфекции или иреактивации инфекции

5. Полуколичественный расчет результатов анализа

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

Образцы сыворотки и плазмы

$$\text{ИФАЕ} = S/CO \times 25$$

6. Интерпретация образцов острой фазы болезни и выздоравливающих

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

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

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 58 образцов сыворотки (30 ВПГ-2 IgG-положительных, 28 ВПГ-2 IgG-отрицательных).

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

ИФА ВПГ 2	IgG
Точность в анализе	3 - 10 %
Точность между анализами	3 - 9 %
Точность между сериями	7 - 11 %
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	96,6 %
*Серологическая чувствительность	96,4 %
*Серологическая точность	96,5 %

*По сравнению с другим коммерчески доступным набором ИФА IgG gG2 специфического ВПГ2.

(Результаты дополнительных исследований 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.

- Результаты анализов новорожденных должны интерпретироваться с максимальной внимательностью. Образцы сыворотки новорожденных должны исследоваться параллельно с сывороткой матери. Наличие антитела IgG в сыворотке новорожденного указывает на наличие врожденной инфекции. Если у новорожденного есть эта инфекция, количество антител IgG может сохраниться на том же уровне, либо возрасти. Если антитело является материнским, в последующих образцах уровень антител IgG уменьшится.

- Серологические результаты иммунодепрессивных пациентов должны интерпретироваться с предостережением.

- Текущие инфекции у беременных женщин 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 или плазме 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