

Простой герпес тип 1 и 2 ИгМ (HSV-1/2-IgM-ELA Test PKS medac)

Иммунологический анализ с дозирочной системой контроля для определения антител IgM к вирусу 1 и 2 (HVS-1/2) простого герпеса в человеческой сыворотке.

Кат. № 104-PKS

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

Введение

Вирус простейшего герпеса (HVS) относится к семейству патогенных *herpesviridae* человека. Они бывают двух типов, и HVS-2, занимая 85% генетической гомологии. Оболочка гликопротеина G определяет специфичность типа вируса. Латентная устойчивость на протяжении жизни в организме после первичного инфицирования типична для вируса HVS. Реактивация происходит примерно в 50% латентно инфицированных людей, и более часто у людей с ослабленным иммунитетом. Вероятно как гетерологическое, так и гомологическое повторное инфицирование. Вирус HVS распространен повсеместно. В Германии преобладает наличие антител к вирусу HVS-1 у более 90% взрослого населения, тогда как всего лишь 15% людей имеют антитела к вирусу HVS-2, причем это соотношение имеет тенденцию к росту.

Передача вируса происходит через слизистую оболочку или через кожный контакт. Инфекции проявляются в виде орофасиального (HVS-1) или генитального (HVS-2) герпеса. Характерная локализация заболевания не обязательна, поскольку оба типа вирусов могут вызывать инфицирование в обеих областях.

Диагностика как первичного, так и реактивированного инфицирования в симптоматической/активной фазе заболевания проводится в большинстве случаев по клиническим признакам или по прямому обнаружению патогенного организма. Лабораторная диагностика вируса HVS используется, главным образом, в случаях экзантемы с неясным генезисом, при подозрении на энцефалитный герпес, общем инфицировании у пациентов с иммунодефицитом, или у новорожденных пациентов, а также при генитальном инфицировании во время беременности. Определение антител производится, главным образом, для подтверждения наличия иммунитета, а также для различения ранней фазы инфекции от повторного заражения. Обнаружение специфических антител IgM свидетельствует об активности вируса. Диагностика по антителам IgM не является надежным методом для дифференциации первичной инфекции от реактивации.

Тест HVS-1/2- IgM-ELA Test PKS medac позволяет обнаруживать антитела IgM в человеческой сыворотке, действие которых направлено против HVS-1 и/или HVS-2. Такой тест можно провести легко и быстро, он также позволяет обеспечить высокоспецифичную и чувствительную диагностическую интерпретацию. Использование

μ-захвата и принципа EIA позволяют проводить высокоспецифичную и чувствительную диагностическую интерпретацию.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Микропланшет, покрытый античеловеческим IgM-иммуноглобулином.

IgM-антитела из пробы пациента выборочно связываются с лунками.

Комплекс из mAb, конъюгированной пероксидазой, и антигенов HVS связывается со специфическими антителами IgM, действующими против HVS-1/2 (AG- антиген, Р-пероксидаза).

Инкубация с субстратом ТМВ (*). Реакция останавливается добавлением серной кислоты. Результат считывается фотометрически.

Преимущества теста

- Отсутствуют неспецифические реакции и нет ложных позитивных результатов, вызванных ревматическими факторами.
- Отсутствует блокировка антител IgM высокими титрами IgG.
- С помощью дозировочной системы контроля можно визуально отслеживать каждый шаг пипетки благодаря изменению цвета.
- Ломающиеся микротитровые стрипы обеспечивают оптимальное использование теста.
- Возможна автоматизация на открытых системах ELISA.

Содержимое упаковки Кат. №.: 104-PKS

1. МТР

Микропланшет: 12 стрипов по 8 лунок, маркированных белым цветом (с рамкой и влагопоглотителем в запаянном вакуумном алюминиевом чехле), ломающихся, U-образных, покрытых козым античеловеческим IgG-иммуноглобулином, BSA (альбумином бычьей сыворотки) и pH-индикатором, готов к использованию.

2. CONTROL –

Отрицательный контроль: 1 флакон 1,5 мл, человеческая сыворотка, готов к использованию, содержит альбумин бычьей сыворотки (BSA), фенол, ProClin™ 300 и гентамицина сульфат.

3. CONTROL +

Положительный контроль: 1 флакон 1,5 мл, человеческая сыворотка, готов к использованию, содержит FKS, альбумин бычьей сыворотки (BSA), фенол, ProClin™ 300 и гентамицина сульфат.

4. **WB**

Промывочный буфер: 1 флакон 100 мл, PBS/Tween (10x), pH 7,2 - 7,4, содержит ProClin™ 300.

5. **VIR-DIL**

Буфер для разбавления проб: 1 флакон 110 мл, PBS/Tween/BSA, pH 7,2 - 7,4, готов к использованию, содержит ProClin™ 300.

6. **ANTIGEN-DIL**

Растворитель антигенов: 1 флакон с 14 мл PBS/Tween, готов к использованию, содержит ProClin™ 300.

7. **ANTIGEN**

Антиген: 6 флаконов, каждый содержит по 2,0 мл высушенного в вакууме HSV-антигена/BSA/FCS.

8. **CON**

Конъюгат: 1 флакон по 0,35 мл, содержит HSV-IgG антитела, моноклональные антитела (мышей) HRP-конъюгированные, готов к использованию, окрашен в красный цвет, содержит альбумин бычьей сыворотки (BSA), фенол, ProClin™ 300 и гентамицина сульфат.

9. **TMB**

Субстрат TMB: 1 флакон 10 мл, готов к использованию.

10. **STOP**

Стоп-раствор: 2 флакона по 11 мл, 0,5 М серной кислоты (H₂SO₄), готов к использованию.

1. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Материал/Реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Тест-набор	закрытый	2...8 °С	До истечения срока годности
Микропланшет	открытый	2...8 °С в сумке с влагопоглотителем	6 недель
Контроли	открытые	2...8 °С	6 недель
Промывочный буфер	разведенный	2...8 °С	6 недель

Буфер для разбавления проб	открытый	2...8 °С	6 недель
Растворитель антигена	открытый	2...8 °С	6 недель
Конъюгат	открытый	2...8 °С	6 недель
Смесь антиген-конъюгат	готовая к использованию	При комнатной температуре	6 часов
Субстрат ТМВ	открытый	2...8 °С	6 недель
Стоп-раствор	открытый	2...8 °С	До истечения срока годности

Не использовать реагенты после истечения указанного срока годности.

2. ДОПОЛНИТЕЛЬНО НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

- 2.1. Aqua ad iniectabilia (вода для инъекций, бидистиллированная H₂O). Использование деионизированной воды может привести к ошибкам в системе теста.
- 2.2. Микропипетки с изменяемым объемом.
- 2.3. Чистые стеклянные или пластиковые сосуды для разведения промывочного буфера и проб.
- 2.4. Соответствующее оборудование для промывания микропланшета (например, мультистеппер или вошер ELISA).
- 2.5. Инкубатор с температурой 37 °С.
- 2.6. Микропланшетный фотометр (ридер) с фильтрами на 450 нм и 620 -650 нм.

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Перед началом теста все компоненты набора должны быть доведены до комнатной температуры.

Посчитайте, сколько лунок вам потребуется.

3.1. Микропланшет

Алюминиевый чехол с влагопоглотителем должен быть плотно закрыт после каждого отбора проб. Условия хранения и стабильность неиспользованных лунок указаны в пункте 1.

Примечание: лунки микропланшета имеют легкий зеленый оттенок. В некоторых случаях в лунках появляются зеленовато-коричневые пятна. Это обусловлено производственным процессом и не влияет на результаты теста.

3.2. Промывочный буфер

Одна часть промывочного буфера (10x) смешивается с девятью частями воды для инъекций (например, 50 мл промывочного буфера (10x) на 450 мл воды для инъекций). На восемь лунок потребуется 10 мл промывочного буфера.

Если в промывочном буфере (10x) присутствуют кристаллы, то перед составлением смеси их необходимо растворить при помощи нагревания (макс. 37 °С) и/или размешивания при комнатной температуре.

3.3 Смесь антиген-конъюгат

Перерастворите антигены из лиофильного состояния с помощью 2,0 мл **антигенного растворителя** для каждого из них. Аккуратно размешайте и позаботьтесь о том, чтобы частицы, прилипшие к пробке, тоже растворились. Добавьте 50 мл конъюгата к 2,0 мл антигена перед использованием.

После перерастворения антигенов и добавления конъюгата смесь антигена и конъюгата приобретает красный цвет и становится готовой к использованию.

Готовая к использованию смесь антигена и конъюгата может быть использована при комнатной температуре в течение 6 часов (см. 1).

Реагенты, специально предназначенные для теста (микропланшет, контроли, конъюгат, калибратор), нельзя смешивать с реагентами из других наборов (партий). В противоположность этому буфер для разбавления проб, промывочный буфер, субстрат ТМВ и стоп-раствор являются, как правило, взаимозаменяемыми для всех вирусологических тестов компании medac.

Не используйте реагенты других производителей.

Действительные и воспроизводимые результаты можно получить только при точном соблюдении технологической инструкции.

4. МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Тест подходит для изучения человеческой сыворотки.

4.2. Сыворотки не требуют предварительной обработки (например, инактивации), тем не менее, они не должны быть заражены микробами и микроорганизмами или содержать эритроциты.

4.3. Сыворотки разводят буфером для разведения проб в пропорции 1:100

5.A. ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ

5.1. Разрежьте алюминиевую сумку над креплением молнии, и достаньте необходимое количество лунок планшета (см. пункт 3.1.).

Лунки микропланшета готовы к использованию и не требуют предварительной промывки.

5.2. Лунка А1 остается свободной в качестве бланка или контрольной лунки (см. пункт 6.A.). С помощью пипетки внесите в лунки микропланшета по 50 мкл каждой из разведенных проб, а также отрицательного контроля и положительного контроля в двойном определении.

После внесения проб (рН-нейтральные или базовые жидкости) цвет меняется на голубой/зеленый. Если в одной из лунок не происходит изменение цвета, это говорит о том, что в лунку не внесены проба или контроль.

При необходимости лунки микропланшета можно выдержать до 30 мин при комнатной температуре перед обработкой.

- 5.3. Инкубируйте лунки в течение 60 мин. (± 5 мин.) при температуре 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) во влажной камере или заклеенными фольгой в качестве покрытия при инкубации.
- 5.4. Приготовьте смесь антиген-конъюгат. (см. 3.3.).
- 5.5. После инкубации три раза промойте лунки микропланшета, используя по 200 мкл промывочного буфера на каждую лунку. Следите за тем, чтобы во время промывки все лунки были заполнены. После окончания промывки слейте содержимое лунок планшета на фильтровальную бумагу.

Не допускайте высыхания лунок! Используйте незамедлительно!

- 5.6. Добавьте смесь антиген-конъюгат (красного цвета) в каждую из лунок (кроме A1).

При проведении теста вручную вносите 50 мкл смеси антиген-конъюгат в каждую лунку.

Пожалуйста, обратите внимание:

При работе с автоматическими системами необходимо внести по 60 мкл смеси антиген-конъюгат в каждую лунку по причине более сильного испарения в инкубационных камерах автоматических систем.

Пригодность теста для автоматизированной обработки была продемонстрирована во время его оценки. Тем не менее, мы рекомендуем проверить совместимость теста с используемыми вами устройствами.

- 5.7. Снова поместите лунки во влажную камеру или заклейте фольгой и инкубируйте в течение 60 мин. (± 5 мин.) при температуре 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$).
- 5.8. После инкубации промойте лунки микропланшета еще раз (см. пункт 5.5).
- 5.9. Внесите с помощью пипетки 50 мкл субстрата ТМВ в каждую лунку (включая A1), поместите во влажную камеру или заклейте фольгой и инкубируйте в темноте в течение 30 мин. (± 2 мин.) при температуре 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). Положительные образцы поменяют цвет на синий.
- 5.10. Остановите реакцию, добавив в каждую лунку (включая A1) по 100 мкл стоп-раствора. Положительные пробы поменяют цвет на желтый.

Перед фотометрическим измерением необходимо протереть наружную поверхность лунок и проследить за тем, чтобы в них не было пузырьков воздуха.

Измерение нужно провести в течение 15 минут после добавления стоп раствора.

5.Б. ТАБЛИЦА К ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ИНСТРУКЦИИ

	Контр. лунка (A1)	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Проба
Отрицательный контроль	-	50 мкл	-	-
Положительный контроль	-	-	50 мкл	-
Проба	-	-	-	50 мкл
Инкубировать в течение 60 минут при 37 °С, промыть 3 раза промывочным буфером по 200 мкл на одну лунку				
Смесь антиген-конъюгат	-	50/60 мкл*)	50/60 мкл*)	50/60 мкл*)
Инкубировать в течение 60 минут при 37 °С, промыть 3 раза промывочным буфером по 200 мкл на одну лунку				
Субстрат ТМВ	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Инкубировать в течение 30 минут при 37 °С в темноте.				
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Фотометрическое считывание результата при 450 нм (длина референс-волны света 620-650 нм)				

*) ручная/автоматическая обработка (см. 5.5)

6.A. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТА (ВАЛИДНОСТЬ)

- * Фотометрическое считывание происходит при длине волны 450 нм (референс-волна 620-650 нм).
- * Оптическая плотность (ОП) контрольной пробы/бланка (лунка A1) вычитается из всех значений ОП.
- * Усредненное значение **негативного контроля** должно быть **< 0,150**
Усредненное значение **позитивного контроля** должно быть **> 0,450**
- * **Cut-off (точка раздела между отрицательным и положительным значениями результата теста) = усредненное значение негативного контроля + 0,140**
- * **Серая зона = Cut-off ± 10 %**

Повторите тесты, если результаты не соответствуют спецификации.

6.B. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ/ПРЕДЕЛЫ МЕТОДА

- * Пробы с величинами оптической плотности ОП ниже нижнего уровня серой зоны засчитываются как **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ** относительно действующего иммунитета.
- * Пробы с величинами ОП в пределах серой зоны засчитываются как **СОМНИТЕЛЬНЫЕ**. Эти пробы необходимо снова протестировать вместе со свежими пробами, взятыми у пациента через 14 дней, на предмет изменения динамики титра.

- * Пробы с величинами ОП выше верхнего уровня серой зоны засчитываются как **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ**.
 - * Результаты теста должны всегда интерпретироваться с учетом клинической картины пациента, результатов исследований HSV-1/2-IgG, HSV-2-IgG и других диагностических параметров.
- В случае подозрения на первичное заражение вирусом HSV-1/2 во время беременности следует провести дальнейшую диагностику, т.е. с PCR.**
- * Нельзя исключать, в одиночных случаях, возможности перекрестных реакций, вызванных антителами на другие вирусы герпеса.
 - * Гемолитическая сыворотка не влияет на результаты теста.

7. ХАРАКТЕРИСТИКИ

Следующие характеристики были получены нами в рамках диагностической оценки.

7.A. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ

468 образцов сывороток (270 из лаборатории проф. Эндерса с коллегами, из г. Штуттгарт, а также 198 из крови доноров из Ганновера и Шуля) были протестированы в сравнении с предварительным определением во время диагностической оценки. Предварительное определение было оценено с использованием двух различных тестов ELISA в качестве основы для сравнения.

Полученные результаты приведены ниже в таблице:

Предварительно определенные параметры

	негативные	Cut-off	позитивные
HSV-1/2-IgM- ELA Test	негативные	409	0
PKS	Cut-off	0	0
medac	позитивные	0	50

Специфичность = 100 %

Чувствительность = 84,7 %

Соответствие: 98,1 %

7.B. ТОЧНЫЕ ЗАМЕРЫ

Проба	Отклонение результатов одного анализа (Intra-assay variation)				Проба	Отклонение результатов разных анализов (Inter-assay variation)			
	Усреднен. значение OD	SD	CV (%)	n		Усреднен. значение OD	SD	CV (%)	n
NC	0,038	0,003	8	22	NC	0,050	0,011	22	11
BC	0,313	0,008	3	22	BC	0,360	0,036	20	11
PC	0,562	0,017	3	22	PC	0,705	0,088	12	11
№ 1	0,035	0,002	6	22	№ 6	0,033	0,007	21	11
№ 2	0,073	0,005	7	22	№ 7	0,098	0,013	13	11
№ 3	0,417	0,017	4	22	№ 8	0,505	0,054	11	11
№ 4	0,609	0,020	3	22	№ 9	0,734	0,061	8	11
№ 5	1,257	0,027	2	22	№ 10	1,365	0,103	8	11

N = отрицательный контроль; BC = слабый положительный контроль (не включен в набор); PC = положительный контроль.

ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

- * Не путайте флаконы с реагентами и их крышки, чтобы избежать перекрестного загрязнения.
- * Сразу же после использования плотно закрывайте флаконы с реагентами, чтобы избежать испарения и микробиологического заражения.
- * После использования реагенты необходимо хранить в соответствии с предписанными условиями, чтобы обеспечить указанный срок службы.
- * Чтобы избежать путаницы и смешения с реагентами другой тестовой системы или партии, все компоненты набора одного теста должны быть помещены сразу после использования в оригинальную упаковку (см. также пункт 3).

УКАЗАНИЯ ПО ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ

- * Соблюдайте общеобязательные государственные правила техники безопасности.
- * Реагенты, в которых использованы компоненты человеческого происхождения, были протестированы на наличие HBsAg, Anti-HIV 1/2 и Anti-HCV и признаны неинфицированными. Тем не менее, с такими реагентами, а также с реагентами, составные части которых имеют животное происхождение (см. «Содержимое упаковки»), необходимо обращаться как с потенциально инфекционно-опасными, чтобы избежать риска заражения.

УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

Остатки химикаты и препаратов относятся к опасным отходам. Утилизация таких отходов регулируется государственными и региональными законами и нормами. Информацию о местах и порядке утилизации предоставляют компетентные органы власти или предприятия, занимающиеся утилизацией отходов.

Дата выпуска: 15.03.2010

ЛИТЕРАТУРА

- Эшли Р. Л., Уальд А. : Генитальный герпес: Обзор эпидемии и потенциальное использование типоспецифической серологии. *Clin Microbiol. Rev.*12 (1), 1-8 (1999).
- Бергстрем Т., Трайбела Е. : Антигенные различия между гликопротеинами вирусов HSV-1 и HSV-2, а также их важность для типоспецифической серологии. *Intervirology* 39, 176-184 (1996).
- Кимберлин Д. У.: Неонатальное инфицирование вирусом простого герпеса. *Clin Microbiol. Rev.* 17 (1), 1-13 (2004).
- Крибс И. М. : Понимание вируса простого герпеса: распространение, диагностика и соображения по методике лечения при беременности. *Журнал Midwifery Womens Health* 53 (3), 202-208 (2008).
- Мертенс Т., Хеллер О., Кленк Х-Д. (Hrsg.): Диагностика и терапия вирусных заболеваний. 126-137, издательство Urban &Fischer (2004).
- Петерсен Е. Е., Дор Х. В., Гросс Г., Петцольд Д., Вайзенбахер Е. Р., Вютцлер П.: Генитальный герпес. 96, 38, А-2358-2364 (1999).
- Зауэрбрай А., Вютцлер П.: Инфицирование вирусами простого герпеса и ветряной оспы при беременности. Современные концепции предотвращения, диагностики и терапии. Часть 1: Инфекции вируса простого герпеса. *Журнал Med. Microbiol. Immunol.* 196 (2), 89-94 (2007).
- Вютцлер П., Зауэрбрай А., Эйхорн У.: Вирологическая диагностика вируса простого герпеса – энцефалита. *Журнал Mikrobiologie* 9, 11-15 (1999).
- Вютцлер П., Дор Х. В., Фарбер И., Эйхорн У., Хельбиг Б., Зауэрбрай А.: Превалирование вируса простого герпеса типа 1 и типа 2 в выбранных популяциях Германии – важность этого для случаев заболевания генитальным герпесом: *Журнал J Med Virol* 61, 201-207 (2000).