

**СОДЕРЖАНИЕ**

|     |  |   |
|-----|--|---|
| 1.  | НАЗНАЧЕНИЕ   | 2 |
| 2.  | ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА                                      | 2 |
| 3.  | АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ                               | 3 |
| 4.  | СОСТАВ НАБОРА  | 4 |
| 5.  | МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ                                      | 5 |
| 6.  | ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ | 5 |
| 7.  | ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА                           | 5 |
| 8.  | УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА                     | 6 |
| 9.  | ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА   | 6 |
| 10. | ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ                                 | 8 |
| 11. | ЛИТЕРАТУРА   | 8 |

**CONTENT**

|     |                                 |    |
|-----|---------------------------------|----|
| 1.  | INTENDED USE                    | 9  |
| 2.  | SUMMARY AND EXPLANATION         | 9  |
| 3.  | PRINCIPLE OF THE TEST           | 9  |
| 4.  | WARNINGS AND PRECAUTIONS        | 10 |
| 5.  | KIT COMPONENTS                  | 11 |
| 6.  | SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE | 12 |
| 7.  | TEST PROCEDURE                  | 12 |
| 8.  | QUALITY CONTROL                 | 14 |
| 9.  | CALCULATION OF RESULTS          | 14 |
| 10. | EXPECTED VALUES                 | 14 |
| 11. | PERFORMANCE CHARACTERISTICS     | 15 |
| 12. | LITERATURE                      | 15 |

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,  
к. б. н. Д. С. Кострикиным

## **ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgM АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ HERPES SIMPLEX VIRUS 1 И 2 ТИПА (HSV 1, 2) В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ**

### **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов «HSV 1,2 IgM-ИФА» предназначен для качественного определения IgM антител к антигенам Herpes Simplex Virus 1 и 2 типа (HSV 1,2) в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Простой герпес (герпетическая инфекция) - это хроническое рецидивирующее инфекционное заболевание, вызванное вирусами простого герпеса типов 1 и 2. Болезнь протекает в локализованных формах с пузырьчатыми высыпаниями на коже и слизистых оболочках, а также в генерализованных формах с поражением многих органов.

**1.3.** При заражении вирусом простого герпеса (ВПГ, HSV) 1 и 2 типов происходит последовательный синтез антител классов IgM, IgG, IgA. Иммуноглобулины класса IgM появляются после десятого дня с момента инфицирования, их уровень нарастает в течение двух недель. Через 7–10 дней после появления IgM синтезируются специфические к ВПГ иммуноглобулины класса IgG, которые присутствуют в организме человека на протяжении всей жизни.

**1.4.** Доказательством первичной герпетической инфекции является определение специфических IgM и\или четырехкратное увеличение уровня специфических антител класса IgG в парных сыворотках, взятых у больного с интервалом в 14–20 дней. Появление антител класса IgM у лица, инфицированного ВПГ, свидетельствует об обострении болезни.

### **2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА**

Определение IgM антител к антигенам Herpes Simplex Virus 1 и 2 типа (HSV 1,2) основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы моноклональные антитела к IgM. Антитела из образца связываются с антителами к IgM на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата антигена HSV 1,2 с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgM антител к антигенам HSV 1,2 в исследуемом образце. Индекс позитивности (ИП, %) IgM антител к антигенам HSV 1,2 в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

#### 3.1. Специфичность и чувствительность.

Набор реагентов «HSV 1,2 IgM-ИФА» определяет коммерческую панель сывороток Anti-HSV1/2 Mixed Titer Performance Panel PTH201 производства Boston Biomedica Company (США) в соответствии с паспортными данными и коррелирует со значениями, полученными на наборе реагентов Gull EIA HSV1/2-IgM (lot 5FKAVG, 5BKARA). Панель содержит 9 положительных и 16 отрицательных образцов. При исследовании специфичности с использованием 47 сывороток, отрицательных на IgM антитела к HSV 1,2 на наборах реагентов DiaSorin (Италия) и NovaTec (Германия), все образцы были определены как отрицательные.

#### 3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания IgM антител к антигенам Herpes Simplex Virus 1 и 2 типа (HSV 1,2) в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «HSV 1,2 IgM-ИФА» не превышает 8,0%.

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на двух сериях набора реагентов «HSV 1,2 IgM-ИФА» (Intra-assay)

| Образец, № | Кол-во повторов | Значение, ОП средняя | CV1, % | CV2, % |
|------------|-----------------|----------------------|--------|--------|
| 1          | 32              | 0.547                | 7.4    | 6.2    |
| 2          | 32              | 1.548                | 5.1    | 4.8    |

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на одной серии набора реагентов «HSV 1,2 IgM-ИФА» в течение трех дней (Inter-assay)

| Образец, № | Кол-во повторов | Значение, ОП средняя | CV1, % |
|------------|-----------------|----------------------|--------|
| 1          | 8               | 0.785                | 8.2    |
| 2          | 8               | 1.95                 | 6.4    |

## 4. СОСТАВ НАБОРА

|    | Код компонента             | Символ                | Наименование  | Кол-во | Ед. | Описание  |
|----|----------------------------|-----------------------|---|--------|-----|---|
| 1  | <b>P10MZ</b>               | SORB MTP              | <b>Планшет</b> 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию  | 1      | шт. | -   |
| 2  | <b>CN104MZ<br/>CP104MZ</b> | CONTROL –<br>CONTROL+ | <b>Контрольные сыворотки</b> (отрицательный и положительный контроли) на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgM антител HSV 1,2, готовы к использованию (0.5 мл и 0.2 мл соответственно) | 2      | шт. | прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета |
| 3  | <b>T104MXZ</b>             | CONJ 11X              | <b>Концентрат конъюгата</b> , (1,25 мл)   | 1      | шт. | прозрачная жидкость синего цвета                                    |
| 4  | <b>ST104MZ</b>             | DIL CONJ              | <b>Буфер для разведения концентрата конъюгата</b> , готов к использованию (12 мл)   | 1      | шт. | прозрачная жидкость желтого цвета                                   |
| 5  | <b>S011Z</b>               | DIL                   | <b>ИФА-Буфер</b> , готов к использованию (11 мл)  | 1      | шт. | прозрачная жидкость синего цвета                                    |
| 6  | <b>R055Z</b>               | SUBS TMB              | <b>Раствор субстрата тетраметилбензидина</b> (ТМБ), готов к использованию (11 мл)   | 1      | шт. | прозрачная бесцветная жидкость                                      |
| 7  | <b>S008Z</b>               | BUF WASH 21X          | <b>Концентрат отмывочного раствора</b> , 21x-кратный (22 мл)  | 1      | шт. | прозрачная бесцветная жидкость                                      |
| 8  | <b>R050Z</b>               | STOP                  | <b>Стоп-реагент</b> , готов к использованию (11 мл)   | 1      | шт. | прозрачная бесцветная жидкость                                      |
| 9  | <b>N003</b>                |                       | Бумага для заклеивания планшета   | 2      | шт. | -   |
| 10 | <b>K104MI</b>              |                       | Инструкция по применению Набора реагентов «HSV 1,2 IgM-ИФА»   | 1      | шт. | -   |
| 11 | <b>K104MQ</b>              |                       | Паспорт контроля качества Набора реагентов «HSV 1,2 IgM-ИФА»  | 1      | шт. | -   |

## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**5.1.** Потенциальный риск применения Набора – класс 26 (ГОСТ Р 51609-2000).

**5.2.** Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

**5.3.** При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

**5.4.** При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

## 6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру +37 °С ±0,1 °С
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 10–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

**7.1.** Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18...+25 °С) не менее 30 мин.

### 7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.

### 7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

### 7.4. Приготовление конъюгата.

Приготовьте конъюгат: для этого разбавьте концентрат конъюгата в 11 раз буфером для разведения концентрата конъюгата. ВНИМАНИЕ! разбавленный раствор конъюгата не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для данной постановки!

Пример: 100 мкл концентрата конъюгата + 1000 мкл буфера для разведения концентрата конъюгата.

## 8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

**8.1.** Набор реагентов «HSV 1,2 IgM-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток

**8.2.** Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 46 исследуемых образцов и 2 проб контрольной сыворотки (всего 96 определений).

**8.3.** В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- контрольные сыворотки после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора.
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

**8.4.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия.

Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

**8.5.** Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышьяные антителла.

**8.6.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

**8.7.** Допускается проведение анализа в монопликатах при использовании автоматического или полуавтоматического анализаторов.

## 9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

|   |  |
|---|--|
| 1 | Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 4 лунки для контрольных сывороток (Отрицательный контроль 3 лунки, Положительный контроль 1 лунка)                               |
| 2 | <b>Внесите во все лунки планшета по 90 мкл ИФА-Буфера.</b>   |
| 3 | <b>Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл контрольных сывороток.</b> В остальные лунки внесите в дубликатах по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.                                   |
| 4 | Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. <b>Инкубируйте планшет в течение 60 минут при температуре +37 °С.</b> |

|    |   |
|----|---|
| 5  | По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и <b>отмойте лунки 3 раза</b> . При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.   |
| 6  | <b>Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.</b>   |
| 7  | Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и <b>инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.</b>   |
| 8  | По окончании инкубации удалите содержимое лунок и <b>отмойте лунки 5 раз.</b>   |
| 9  | <b>Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина.</b> Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. <b>Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут</b> в зависимости от степени развития синего окрашивания.   |
| 10 | <b>Внесите во все лунки</b> с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, <b>по 100 мкл стоп-реагента</b> , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.   |
| 11 | <b>Измерьте величину оптической плотности (ОП)</b> содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования <b>при длине волны 450 нм</b> . Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.  |
| 12 | <p><b>Рассчитайте содержание IgM антител к антигенам Herpes Simplex Virus 1 и 2 типа (HSV 1,2) в исследуемых образцах.</b> Для этого:</p> <p>1. Рассчитайте среднее значение ОП Отрицательного контроля:</p> $(CN104MZ)_{Cp} = (OP1 (CN104MZ) + OP2 (CN104MZ) + OP3 (CN104MZ)) / 3;$ <p>Результаты анализа считать достоверными, если</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ОП Положительного контроля не ниже 1.0 оптических единиц (ОЕ)</li> <li>- ОП Отрицательного контроля не выше 0.15 ОЕ во всех лунках</li> <li>- ОП каждого значения Отрицательного контроля отличается не более чем в два раза от среднего значения отрицательного контроля, т. е. <math>OP (CN104MZ)_{Cp} \times 0.5 &lt; OPn (CN104MZ) &lt; OP (CN104MZ)_{Cp} \times 2.0</math></li> </ul> <p>если одно из значений Отрицательного контроля выходит за пределы этого интервала, то его значение не участвует в расчете <math>OP (CN104MZ)_{Cp}</math></p> <p>2. Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.2</p> <p><b>Cut off = ОП (CN104MZ)<sub>Cp</sub> + 0.2</b></p> <p>3. Рассчитайте Индекс Позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на значение Cut off</p> <p><b>ИП = ОП<sub>образца</sub> / Cut off</b></p> |

## 10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

**10.1.** Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

### Интерпретация результатов:

**При ИП > 1.1 образец положительный,**

**при ИП < 0.9 – отрицательный.**

При значении ИП, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 – результат в пограничной зоне (+/-).

Такие сыворотки рекомендуется исследовать повторно. Если повторный полученный результат будет неопределенным, то следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2–4 недели. В случае получения неопределенных результатов такие образцы считать отрицательными.

## 11. ЛИТЕРАТУРА

1. Исаков В.А., Борисова В.В., Исаков Д.В. Герпес: патогенез и лабораторная диагностика. Руководство для врачей – СПб: Лань – 1999 – с.192
2. Cowan F.M., Johnson A.M., Ashley R. et al. Relation ship between antibodies to herpes simplex virus (HSV) and symptoms of HSV infection // J. Infect. Dis. – 1996 – v.174 – p.470-475
3. Munday P.E., Vuddamalay J., Slomka M.J. et al. Role of type specific herpes simplex virus serology in the diagnosis and management of genital herpes // Sex Transm. Inf – 1998 – v.74 – p.175-178
4. Roest R.W., van der Meijden W.I., van Dijk G. et al. Prevalence and association between herpes simplex viruses types 1- and 2-specific antibodies in attendees at a sexually transmitted disease clinic. // Int Epidemiol. – 2001 – v.30 – p.580-588
5. Whitley R/I/ Herpes simplex virusinfections. In: Infection Diseases of the Fetus and Newborn Infants (Remington JS, Klein JO eds.) – Philadelphia: WB Saunders, 1990 – p.282-305

По вопросам, касающимся качества Набора **«HSV 1,2 IgM-ИФА»**, следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:

105043, Москва, а/я 58,

тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: [qcs@xema.ru](mailto:qcs@xema.ru)

интернет: [www.xema-medica.com](http://www.xema-medica.com)

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,  
к. б. н. Д. С. Кострикин



*Instruction for use*

## **A solid-phase enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM antibodies to HSV 1/2 in human serum or plasma**

### **1. INTENDED USE**

A solid-phase enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM antibodies to HSV 1/2 in serum or plasma.

This kit is designed for measurement of IgM antibodies to HSV 1/2 in serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 46 unknown samples in duplicates.

### **2. SUMMARY AND EXPLANATION**

Herpes simplex virus (HSV) infection is a chronic recurrent infectious disease caused by Herpes simplex viruses, types 1 and 2. The disease may be manifested as a local skin and/or mucosal vesicular rash or as a generalized form with multi-organ damage.

During HSV infection, a sequential synthesis of HSV-specific IgM, IgG and IgA occurs. IgM antibodies appear 10 or more days following infection, their level continuously rising during two weeks. HSV-specific IgG appear 7–10 days following appearance of IgM and persist lifelong.

A primary HSV infection is diagnosed by appearance of HSV-specific IgM and/or a 4-fold increase of HSV-specific IgG in sequential samples taken with 14-20 days interval. Appearance of HSV-specific IgM in an HSV-infected person indicates exacerbation of the disease.

### **3. PRINCIPLE OF THE TEST**

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by murine monoclonal antibodies to IgM. Antibodies from the specimen bind coated murine monoclonal antibodies to IgM on the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. HSV 1,2, labelled with peroxidase enzyme, is then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Positivity index (PI, %) is calculated by the formula (see Calculations). Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

#### **4. WARNINGS AND PRECAUTIONS**

**4.1.** For professional use only.

**4.2.** This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

**4.3. INFECTION HAZARD:** There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

**4.4.** Avoid contact with stop solution containing 5,0% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.

**4.5.** Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

**4.6.** Do not use the kit beyond the expiration date.

**4.7.** All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

**4.8.** Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

**4.9.** Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

**4.10.** Do not mix reagents from different lots.

**4.11.** Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

**4.12.** Do not pipette reagents by mouth.

**4.13.** Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

**4.14.** Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

**4.15.** The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

## 5. KIT COMPONENTS

### 5.1. Contents of the Kit

|    | Symbol                  | Description                             | Qty  | Units | Colour code | Stability of opened/diluted components |  |
|----|-------------------------|---|--|-------|-------------|--|--|
| 1  | SORB MTP                | HSV 1, 2 IgM EIA strips, 8x12 wells     | polystyrene microwells coated with murine monoclonal antibodies to IgM   | 1     | pcs         |  | until exp.date   |
| 2  | CONTROL -,<br>CONTROL + | Control sera (0.5 ml and 0.2 ml, resp.) | (CONTROL-) dilution of preselected human serum, not containing IgM antibodies to HSV 1, 2 with preservative - 0,01% Bronidox L, 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride, colourless; (CONTROL+) dilution of preselected human serum with high content of human IgM antibodies to HSV 1, 2 with preservative - 0,01% Bronidox L, 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride; also contains red dye | 2     | pcs         | colourless ; red                       | 2 months   |
| 3  | CONJ 11X                | Conjugate concentrate, 1.25 ml          | Solution of HSV 1,2 coupled with horseradish peroxidase diluted on phosphate buffered saline with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative and blue dye  | 1     | pcs         | blue                                   | until exp. date  |
| 4  | DIL CONJ                | Conjugate dilution buffer 12 ml         | tris buffered, BSA and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative; contains yellow dye   | 1     | pcs         | yellow                                 | until exp.date   |
| 5  | DIL                     | EIA buffer 11 ml                        | phosphate buffered saline, casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative; contains blue dye   | 1     | pcs         | blue                                   | until exp.date   |
| 6  | SUBS TMB                | Substrate solution, 11 ml               | ready-to-use single-component tetramethylbenzidine (TMB) solution.   | 1     | pcs         | colourless                             | until exp.date   |
| 7  | BUF WASH 21X            | Washing solution concentrate 21x, 22 ml | aqueous solution of sodium chloride and detergent (Tween 20), contains proClin300 as a preservative  | 1     | pcs         | colourless                             | Concentrate - until exp.date<br>Diluted washing solution - 1 month at 2-8 °C or 5 days at RT |
| 8  | STOP                    | Stop solution, 11 ml                    | 5,0% vol/vol solution of sulphuric acid  | 1     | pcs         | colourless                             | until exp.date   |
| 9  | N003                    | Plate sealing tape                      |  | 2     | pcs         |  | N/A  |
| 10 | K104MI                  | Instruction HSV 1, 2 IgM EIA            |  | 1     | pcs         |  | N/A  |
| 11 | K104MQ                  | QC data sheet HSV 1, 2 IgM EIA          |  | 1     | pcs         |  | N/A  |

**5.2. Equipment and material required but not provided**

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for +37 °C ±0.1 °C
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

**5.3. Storage and stability of the Kit**

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

**6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE**

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

**7. TEST PROCEDURE****7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

**7.2. Procedural Note:**

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

**7.3. Assay flowchart**

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

**7.4. Alternative units:****7.5. Assay procedure**

|    |  |
|----|--|
| 1  | Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 4 wells for control samples CONTROL - CONTROL + (3 and 1 wells resp.) and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.              |
| 2  | Pipet 90 µl of EIA buffer into each well.  |
| 3  | Pipet 10 µl of control samples CONTROL - CONTROL + and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).   |
| 4  | Incubate 60 minutes at 37 °C .   |
| 5  | Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate BUF WASH 21X by distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times  |
| 6  | Prepare working conjugate solution by 11x dilution of conjugate concentrate CONJ 11X by conjugate dilution buffer. Attention: working conjugate solution is unstable and should be not stored! Prepare the volume required for actual assay run. |
| 7  | Dispense 100 µl of working conjugate solution into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape.  |
| 8  | Incubate 30 minutes at 37 °C .   |
| 9  | Wash the strips 5 times.   |
| 10 | Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells   |
| 11 | Incubate 10–20 minutes at +18...+25 °C   |
| 12 | Dispense 100 µl of STOP into the wells.  |
| 12 | Measure OD (optical density) at 450 nm.  |
| 13 | Set photometer blank on air  |

## 8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

For the assay to be valid, the following requirements should be met:

1. OD450 for CONTROL+ should be  $\geq 1.0$  AU.
2. OD450 for CONTROL- should not be more than 0.15 AU for all replicates.
3. OD450 for any CONTROL- replicate should be within 50%-150% of the mean OD450 value for CONTROL-. If any value lies outside this range (although meets requirement #2), it should be discarded and not used for calculation of the mean OD450 value for CONTROL-

## 9. CALCULATION OF RESULTS

**9.1.** Calculate the mean absorbance values (OD450) for CONTROL- in triplicates and each pair of samples.

**9.2.** Calculate the cut-off value: (mean OD450 for CONTROL-) +0.2

**9.3.** Calculate Positivity Index (PI) for each sample:

$PI = \text{mean OD450}(\text{sample}) / \text{Cut-off}$

## 10. EXPECTED VALUES AND ASSAY LIMITATIONS

If PI value is greater than 1.1, the result is POSITIVE.

If PI value is less than 0.9, the result is NEGATIVE.

If PI value is between 0.9 and 1.1, the result is EQUIVOCAL. Such samples should be retested. If the result is equivocal again, a new sample should be obtained 2-4 weeks later and tested again. If the result remains equivocal, the sample should be considered negative. Therapeutic consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutic measures.

NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 11.1. Analytical specificity

Specificity of the test was evaluated on 47 serum specimens found negative in DiaSorin (Italy) and NovaTec (Germany). All tested specimens were found negative. Based on these data, specificity of the test is 100%

### 11.2. Analytical sensitivity

The kit HSV1,2 IgM EIA was evaluated using panel of naturally occurring serum and plasma specimens from Boston Biomedica, Inc ( Anti-HSV1/2 Mixed Titer Performance Panel PTH201).

### 11.3. Precision

Intra-assay precision is shown below:

| Serum, no | duplicated | value, K | CV1, % | CV2, % |
|-----------|------------|----------|--------|--------|
| 1         | 32         | 0.547    | 7.4    | 6.2    |
| 2         | 32         | 1.548    | 5.1    | 4.8    |

Inter-assay precision is shown below:

| Serum, no | duplicated | value, K | CV, % |
|-----------|------------|----------|-------|
| 1         | 8          | 0.785    | 8.2   |
| 2         | 8          | 1.95     | 6.4   |

## 12. LITERATURE

1. Isakov V.A., Borisova V.V., Isakov D.V. Herpes infection: pathogenesis and laboratory diagnostics. A guideline for physicians – St.-Petersburg, Lanj - 1999 - p.192

2. Cowan F.M., Johnson A.M., Ashley R. et al. Relation ship between antibodies to herpes simplex virus (HSV) and symptoms of HSV infection // J. Infect. Dis. - 1996 - v.174-p.470-475

3. Munday P.E., Vuddamalay J., Slomka M.J. et al. Role of type specific herpes simplex virus serology in the diagnosis and management of genital herpes // Sex Transm. Inf - 1998-v.74 - p.175-178

4. Roest R.W., van der Meijden W.I., van Dijk G. et al. Prevalence and association between herpes simplex viruses types 1- and 2-specific antibodies in attendees at a sexually transmitted disease clinic. // Int Epidemiol. - 2001 - v.30 - p.580-588

5. Whitley R/I/ Herpes simplex virusinfections. In: Infection Diseases of the Fetus and Newborn Infants (Remington JS, Klein JO eds.) - Philadelphia: WB Saunders, 1990- p.282-305

