



**Vitrotest**®

# Vitrotest HSV1/2-IgM ultra

Імуноферментна тест-система  
для якісного визначення антитіл класу IgM  
до вірусу простого герпесу першого та другого типів

## Інструкція з використання

1. Призначення
2. Клінічне значення
3. Принцип аналізу
4. Матеріали та обладнання
5. Застереження та техніка безпеки
6. Зберігання та стабільність
7. Підготовка зразків
8. Підготовка реагентів
9. Процедура аналізу
10. Облік результатів та їх інтерпретація
11. Діагностичні характеристики тесту
12. Обмеження аналізу

Література

Умовні позначення

IVD

Для in vitro діагностики

REF

TK008

**«Vitrotest HSV1/2-IgM ultra»**  
**Імуноферментна тест-система для якісного визначення**  
**антитіл класу IgM до вірусу простого герпесу першого та другого типів**

### 1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest HSV1/2-IgM ultra» призначена для якісного визначення антитіл класу IgM до вірусу простого герпесу першого та другого типів (ВПГ1/2) у сироватці чи плазмі крові людини.

Тест-набір може бути застосований як для проведення ІФА з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

### 2. Клінічне значення

Простий герпес (герпетична інфекція) – це хронічне рецидивуюче інфекційне захворювання, викликане вірусами простого герпесу типів 1 та 2. Хвороба перебігає в локалізованих формах з пухирцевими висипаннями на шкірі та слизових оболонках, а також у генералізованих формах з ураженням багатьох органів.

При зараженні вірусом простого герпесу 1 та 2 типів відбувається послідовний синтез антитіл класів IgM, IgG та IgA. Специфічні імуноглобуліни класу IgM з'являються після десятого дня з моменту інфікування, їх рівень наростає протягом двох тижнів. Через 7-10 днів від появи IgM з'являються специфічні до ВПГ імуноглобуліни класу IgG, що зберігаються в організмі людини протягом життя.

Доказом первинної ВПГ інфекції є виявлення специфічних IgM та/або чотирьохкратне підвищення рівнів специфічних антитіл класу IgG у парних сироватках, взятих у хворого з інтервалом у 14-20 днів. Поява антитіл класу IgM у особи, інфікованої ВПГ, свідчить про загострення хвороби.

### 3. Принцип аналізу

Виявлення антитіл класу IgM до вірусу простого герпесу першого та другого типів в тест-системі «Vitrotest HSV1/2-IgM ultra» ґрунтується на принципі «IgM-захвату» твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА).

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованими в лунках моноклональними антитілами, специфічними до імуноглобулінів класу IgM людини. Під час інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається «захват» імуноглобулінів класу IgM моноклональними антитілами на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів в лунки додається кон'югат пероксидази хрому з рекомбінантними антигенами – аналогами глікопротеїнів вірусу простого герпесу першого та другого типів gG1 та gG2, відповідно. Кон'югат зв'язується зі специфічними антитілами класу IgM в складі імунних комплексів на твердій фазі. Незв'язані компоненти відмиваються. Візуалізація утворених імунних комплексів відбувається при внесенні в лунки розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). В результаті реакції розчин в лунках, де утворились імунні комплекси, забарвлюється в синій колір. Реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту, при цьому синій колір забарвлених лунок змінюється на жовтий. Результат аналізу визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620 нм.

### 4. Матеріали та обладнання

#### 4.1 Склад набору

**ІФА-планшет** – 12 стрипів по 8 лунок (з можливістю відокремлення лунок), з іммобілізованими моноклональними антитілами, специфічними до імуноглобулінів класу IgM людини.

**Розчин для промивання Tr100 (20x)** – 1 флакон, що містить 50 мл 20-ти кратного концентрату фосфатного буферу з Тритоном-Х100 (безбарвний).

**Розчин для розведення сироваток** – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину з екстрактом молока та консервантом (фіолетовий).

**Позитивний контроль** – 1 мікропробірка, що містить 0,3 мл розчину імуноглобулінів класу IgM людини зшитих з моноклональними антитілами, специфічними до пероксидази хрому (рожевий).

**Негативний контроль** – 1 мікропробірка, що містить 0,5 мл негативної сироватки крові людини (жовтий).

**Розчин для розведення кон'югату** – 1 флакон, що містить 14 мл буферного розчину з екстрактом молока та консервантом (жовтий).

**Кон'югат (11x)** – 1 мікропробірка, що містить 1,4 мл 11-ти кратного кон'югату рекомбінантних антигенів вірусу простого герпесу першого та другого типів gG1 та gG2 з пероксидазою хрому у фосфатному буфері зі стабілізаторами (синій).

**Розчин ТМБ** – 1 флакон, що містить 12 мл розчину ТМБ і перекису водню з стабілізатором та консервантом (безбарвний).

**Стоп-реагент** – 1 флакон, що містить 12 мл розчину 0,5М сірчаної кислоти.

**Клейка плівка** – 2 аркуші плівки для заклеювання планшетів під час інкубації.

**Бланк внесення проб** – 1 аркуш для запису схеми внесення зразків.

**Інструкція** – 1 екземпляр інструкції з використання.

#### 4.2 Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

Для постановки аналізу необхідні такі додаткові реактиви, матеріали та обладнання:

- деіонізована або дистильована вода;
  - фільтрувальний папір;
  - мірні циліндри на 10, 200 та 1000 мл;
  - одноразові рукавички;
  - розчин перекису водню 6%;
  - одноразовий або чистий посуд для приготування реактивів (флакони та ванночки);
  - таймер;
  - одно- та багатоканальні автоматичні піпетки змінного об'єму на 20, 200 та 1000 мкл та наконечники до них;
  - термостат на 37°C;
  - контейнер для твердих відходів;
  - контейнер для рідких відходів;
  - <sup>1</sup>автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
  - <sup>2</sup>одно- або багатоканальний спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 нм.
- <sup>1,2</sup>Будь ласка, проконсультуйтеся з нами щодо адаптації Вашого обладнання.

### 5. Застереження та техніка безпеки

#### 5.1. Застереження:

– не використовуйте компоненти тест-системи після закінчення строку придатності;  
– не використовуйте під час аналізу та не змішуйте компоненти різних серій та компоненти із тест-систем різних нозологій;

– не використовуйте реактиви інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest™;

*Примітка: Розчин для промивання Tr100 (10x), Розчин ТМБ та Стоп-реагент допускається використовувати інших серій, які відрізняються від тих, що вкладені до тест-набору. Ці реактиви використовуються в інших тест-системах виробництва ТОВ „ІВК „Рамінтек”. Будь ласка, проконсультуйтеся з нами для отримання детальної інформації.*

– після використання реагенту закривайте кожен флакон своєю кришкою;

– чітко дотримуйтесь режиму промивання планшетів, вказаного в пунктах інструкції;

– під час промивання контролюйте наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;

– кожного разу використовуйте новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;

– уникайте потрапляння прямих сонячних променів на реактиви тест-системи;

– розчин ТМБ має бути безбарвним або світло блакитним перед використанням, якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір, його не можна використовувати. Уникайте контакту розчину ТМБ з металами або іонами металів. Для роботи використовуйте лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;

– для внесення в лунки планшета ТМБ-субстрату використовуйте лише нові наконечники, що не були у використанні;

– ні в якому разі не використовуйте один й той же посуд для розчину кон'югату та хромогену.

#### 5.2. Техніка безпеки:

– всі реактиви набору призначені лише для in vitro діагностики;

– постановку аналізу проводити лише у гумових рукавичках;

– не піпетувати розчини ротом;

– в контролях тест-системи «Vitrotest HSV1/2-IgM ultra» не виявлено HBsAg, а також антитіла до ВІЛ 1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однак працювати із контролями та досліджуваними сироватками слід як із потенційно інфекційним матеріалом;

– рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6% упродовж 3 годин при кімнатній температурі, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5% протягом 30 хвилин, або іншими дезінфікуючими агентами;

– тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування при 121°C упродовж 1 години;

– не автоклавайте розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;

– слід уникати розбризкування розчинів ТМБ та стоп-реагенту, а також їх контакту із слизовими оболонками та шкірою;

– у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти, наприклад, сироваток, обробити поверхню 6%-м перекисом водню, а потім витерти насухо фільтрувальним папером.

### 6. Зберігання та стабільність

Реактиви тест-системи стабільні протягом строку придатності вказаного на етикетці, якщо їх зберігати при 2-8°C.

Транспортувати набір при температурі 2-8°C. Допускається одноразове транспортування при температурі не вище 20°C протягом двох діб.

## 7. Підготовка зразків

Зразки сироваток чи плазми крові можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 3 діб після забору. Допускається більш тривале зберігання зразків замороженими при температурі від -20 до -70°C. Заморожені зразки перед використанням розморожують та витримують при кімнатній температурі упродовж 30 хвилин. Після розморожування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникайте повторного заморожування-відтаювання досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільняються від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./хв. протягом 10-15 хвилин. Не використовуйте зразки сироваток із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом.

## 8. Підготовка реагентів

*Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «Vitrotest HSV1/2-IgM ultra» при кімнатній температурі 18-25°C протягом 30 хвилин перед використанням.*

### 8.1. Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте ІФА-планшет лише після витримання 30 хвилин при кімнатній температурі. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте та **зберігайте щільно закритим на замок (zip-lock)** при температурі 2-8°C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

### 8.2. Розчин для промивання

Флакон містить 50 мл 20х концентрату буферу з детергентом. Для приготування розчину для промивання розведіть концентрат 1:20 (тобто, 1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад: на 4 мл концентрату – 76 мл дистильованої води, що достатньо для одного стрипу. У випадку наявності кристалів в концентраті розчину для промивання прогрійте флакон при 37°C протягом 15-20 хвилин.

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 7 діб.

### 8.3. Розчин кон'югату

Робоче розведення кон'югату готується наступним чином:

Розведіть концентрат кон'югату 11х (синій) у чистому флаконі розчином для розведення кон'югату (жовтий) у співвідношенні 1:11 (тобто, 1+10), розчин забарвлюється у зелений колір. Наприклад, для 8 лунок аналізу достатньо додати до 1 мл розчину для розведення кон'югату 100 мкл концентрату кон'югату.

Розчин кон'югату в робочому розведенні стабільний протягом доби за умови зберігання при 2-8°C.

## 9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з контролями обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно пункту 8.2.

9.4. В лунки стрипів внести по 90 мкл розчину для розведення сироваток.

9.5. Внести в лунки контролі та досліджувані зразки в наступному порядку: в лунку А1 – 10 мкл позитивного контролю, в лунки В1, С1 та D1 – по 10 мкл негативного контролю, в решту лунок – по 10 мкл досліджуваних сироваток. Під час внесення сироваток та контролів обережно піпетуйте суміш – відбувається зміна кольору розчину для розведення сироваток з фіолетового на синій.

9.6. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом **30 хвилин при 37°C**.

9.7. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 30 секунд;
- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;
- повторити процедуру промивання ще чотири рази;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.8. Приготувати розчин кон'югату згідно пункту 8.3.

9.9. В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом **30 хвилин при кімнатній температурі 18-25°C**.

9.10. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в пункті 9.7.

9.11. «Розчин ТМБ» є готовим для використання розчином ТМБ-субстрату з перекисом водню. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Вносити розчин ТМБ слід чистим новим наконечником: обережно відібрати розчин ТМБ з флакону і, не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 мкл розчину ТМБ в лунки.

9.12. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25°C.

9.13. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні розчину ТМБ.

9.14. Виміряти на рідері оптичну густина в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

## 10. Облік результатів та їх інтерпретація

### 10.1. Достовірність результатів аналізу:

Розрахувати середнє значення негативного контролю

$$ОГ K_{-середнє} = (ОГ K_{-1} + ОГ K_{-2} + ОГ K_{-3}) / 3$$

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

– оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 1,2 оптичних одиниць (ОО),

– ОГ в лунках з негативним контролем (ОГ K-) не вище 0,15 ОО.

– оптична густина кожного значення негативного контролю відрізняється не більше ніж в два рази від середнього значення негативного контролю, тобто

$$ОГ K_{-середнє} \times 0,5 \leq ОГ K_{-n} \leq ОГ K_{-середнє} \times 2,0$$

Якщо одне із значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення K- за рештою значень негативного контролю.

### 10.2. Облік результатів аналізу.

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,20, тобто

$$Граничне значення = ОГ K_{-середнє} + 0,20$$

Для кожного досліджуваного зразка розрахувати індекс позитивності (ІП)

$$ІП = \frac{ОГ досліджуваного зразка}{граничне значення}$$

### 10.3. Інтерпретація результатів.

Досліджувані зразки із значенням ІП **вище 1,1** вважати **позитивними** (ІП > 1,1).

Зразки із значенням ІП **нижче 0,9** вважати **негативними** (ІП < 0,9)

Зразки із значенням ІП **в межах 0,9-1,1** вважати **невизначеними** (0,9 ≤ ІП ≤ 1,1). Такі сироватки рекомендується дослідити повторно в двох лунках тест-системи. Якщо результати знову будуть в межах невизначених слід провести тестування сироватки, отриманої через 2-4 тижні. В разі одержання невизначених результатів такі зразки вважати негативними.

## 11. Діагностичні характеристики тесту

### 11.1. Специфічність та чутливість

Специфічність та чутливість тест-системи «Vitrotest HSV1/2-IgM ultra» оцінювали на комерційній панелі сироваток виробництва „SeraCare Life Sciences” (США) «Anti-Herpes Simplex Virus Type 1 & 2 Mixed Titer Performance Panel РТН 201», що складається з 25 охарактеризованих зразків сироваток та плазми крові дев'ять з яких містять специфічні до ВПГ1/2 антитіла класу IgM. Всі зразки панелі РТН 201 в тест-системі «Vitrotest HSV1/2-IgM ultra» визначались коректно, відповідно до паспортних даних. При дослідженні специфічності тест-набору «Vitrotest HSV1/2-IgM ultra» з використанням 47 сироваток, негативних на антитіла до вірусу простого герпесу першого та другого типів всі 47 зразків були виявлені негативними.

### 11.2. Точність

Відтворюваність результатів в межах однієї постановки аналізу (Intra assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем анти-ВПГ1/2 антитіл класу IgM оцінювали в 32 повторях на двох серіях тест-систем.

№ сироватки	ІП	CV <sub>1</sub> , %	CV <sub>2</sub> , %
214	2,1	7,4	6,2
225	6,9	5,1	4,8

*Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)*

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем анти-ВПГ 1/2 антитіл класу IgM оцінювали протягом трьох днів в трьох постановках аналізу, по 8 повторів в кожному аналізі.

№ сироватки	ІП	CV, %
214	2,3	8,2
225	7,2	6,4

## 12. Обмеження аналізу

Позитивний результат в тест-системі «Vitrotest HSV1/2-IgM ultra» є свідченням наявності у пацієнта антитіл класу IgM специфічних до вірусу простого герпесу першого та/або другого типу.

Антитіла класу IgM, специфічні до ВПГ1/2, присутні при гострій (активній) герпетичній інфекції. Не завжди антитіла цього класу є доказом первинної герпетичної інфекції, при рецидиві герпетичної інфекції також можуть синтезуватись специфічні антитіла класу IgM.

Для постановки діагнозу слід враховувати як результати лабораторних досліджень так і клінічні прояви захворювання.

## Література

1. Исаков В.А., Борисова В.В., Исаков Д.В. Герпес: патогенез и лабораторная диагностика. Руководство для врачей. – СПб.: Лань. – 1999. – 192 с.
2. Cowan F.M., Johnson A.M., Ashley R. et al. Relationship 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 virus infections. In: Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infants (Remington JS, Klein JO, eds). – Philadelphia: WB Saunders, 1990. – P. 282-305.

## Умовні позначення

Інтерпретація умовних символів:

	«Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i> »
	«Код партії»
	«Номер за каталогом»
	«Дата виготовлення»
	«Використати до»
	«Температурне обмеження»
	«Містить достатньо для (n-) випробувань»
	«Берегти від прямих сонячних променів»
	«Увага, дивись інструкцію з використання»
	«Виробник»
	«Ознайомлення з інструкціями для застосування»

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



Товариство з обмеженою відповідальністю «Іноваційно-виробнича компанія «Рамінтек»  
03039 Україна, м. Київ, пр-т 40-річчя Жовтня, 7, оф. 227 (юридична адреса)  
07300 м. Вишгород, Київська обл., вул. Шолуденка, 19 (фактична адреса)  
тел. +380 44 222-76-72



## Схема проведення аналізу в тест-системі «Vitrotest HSV1/2-IgM ultra»

Витримати реагенти 30 хв. при 18-25°C

Приготувати розчин для промивання планшета, розвести 20х концентрат розчину для промивання Tr100 очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19). Наприклад, 4 мл розчину + 76 мл води

Заповнити бланк внесення проб для аналізу

В лунки планшета внести по 90 мкл розчину для розведення сироваток

Внести по 10 мкл контролів та досліджуваних зразків в лунки:

A1 – позитивний контроль, B1, C1, D1 – негативний контроль,

E1 та решта лунок – досліджувані зразки

*Під час внесення сироваток відбувається зміна кольору розчину в лунках з фіолетового на синій*

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при температурі 37°C

Промити лунки 5 разів

Розвести концентрат кон'югату (11×) (*синій*) розчином для розведення кон'югату (*жовтий*) 1:11 (тобто, 1+10). Наприклад, 100 мкл кон'югату + 1000 мкл розчину (*розчин забарвлюється в зелений колір*)

В лунки стрипів внести по 100 мкл розведеного кон'югату

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при кімнатній температурі 18-25°C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату

Інкубувати планшет 30 хв. в темряві при кімнатній температурі (18-25°C)

В лунки стрипів внести по 100 мкл стоп-реагенту

Виміряти оптичну густину в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм

Розрахувати граничне значення (ГЗ) в тест-системі «Vitrotest HSV1/2-IgM ultra» за формулою:

$$ГЗ = ОГ К - середнє + 0,20$$

Розрахувати індекс позитивності (ІП) для досліджуваних зразків:  $ІП = \frac{ОГ \text{ досліджуваного зразка}}{\text{граничне значення}}$

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці:

Значення ІП	Результат
ІП зразка >1,1	позитивний
$0,9 \leq$ ІП зразка $\leq 1,1$	невизначений
ІП зразка <0,9	негативний