



Вирус Простого Герпеса 2 типа (ВПГ-2)

Кат. № : 3487
Количество : 96
Производитель : DRG (Германия)

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

Методика от 01-2008
Версия 6.0

1. Введение

Набор иммуноферментного анализа для качественного и полуколичественного определения антител класса IgG к Вирусу простого Герпеса 2-типа в сыворотке человека.

2. Принцип анализа

Набор **NOVUM HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 IgG ELISA** это набор для определения антител класса IgG к ВПГ -2 в сыворотке человека.

Микротитровальные стрипованные лунки в качестве твердой фазы покрыты антигенами к цитомегаловирусу. **Разведенные** образцы пациента и **готовые к использованию** контроли пипетируются в лунки. Во время инкубации специфические к ВПГ-2 антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляются антитела IgG к ВПГ -2, конъюгированные пероксидазой хрена. Во время второй инкубации этот конъюгат связывается только с антителами IgG, в результате чего формируются иммунные комплексы с ферментативными связями.

После второй промывки (для удаления несвязанного конъюгата) сформированные иммунные комплексы (в случае положительного результата) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ, в результате чего появляется голубое окрашивание. Голубое окрашивание меняется на желтое при добавлении серной кислоты для остановки индикаторной реакции.

Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител IgG специфичных к ВПГ-2. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA - ридере.

3. Предостережения

- Данный набор предназначен только для диагностики «in-vitro».
- Не использовать вместе реагенты или стрипы из разных лотов.
- Не использовать вместе реагенты разных производителей.
- Не использовать реагенты после окончания срока годности, указанного на этикетке.
- Использовать только чистые наконечники для пипеток, пипетки и лабораторный инвентарь.
- Не путать колпачки реагентов во избежание кросс-контаминации.
- Плотно закрывать флаконы с реагентами сразу после использования.
- После первого открывания и последующего хранения проверять флаконы конъюгата и контролей на микробную контаминацию перед дальнейшим использованием.
- **Во избежание кросс-контаминации и ложно завышенных результатов пипетировать образцы пациентов и раскапывать конъюгат без расплескивания прямо на дно лунок.**
- Во время инкубации накрывать микротитровальные стрипы пленкой для предотвращения испарения.

4. Компоненты набора

1. Микротитровальные стрипы с ВПГ 2 антигенами (IgG) 12x8- делимых стрипов с антигенами ВПГ-2, вкл. 1 держатель для стрипов и 1 пленку для накрывания
2. Раствор для разведения образцов IgG *******, 100 мл готов к употреб., желтого цвета; pH 7.2 ± 0.2
3. Положительный контроль на ВПГ2 IgG *******, 2 мл готов к употреб., желтого цвета красный колпачок.
4. Отрицательный контроль на ВПГ2 IgG *******, 2 мл готов к употреб., желтого цвета, желтый колпачок.

5. Cut-off контроль на ВПГ2 IgG *******, 2 мл готов к употреб., желтого цвета, черный колпачок.

6. Ферментный конъюгат IgG антител к ВПГ 2 ******, 20 мл готов к употреб., красного цвета, антитела к человеческому IgG, конъюгированные пероксидазой хрена.

7. Раствор субстрата, 14 мл готов к употреб., ТМБ.

8. Стоп-раствор, 14 мл готов к употреб., содержит 0,5 моль/л H₂SO₄.

Предупреждение: Раздражает глаза и кожу.

9. Промывочный раствор*, 30 мл концентрация 20x на 600 мл; pH 7.2 ± 0.2. см. „Подготовка реагентов“.

*⇒ содержит 0.03 % ProClin 300

**⇒ содержит 0.3 % ProClin 300+0.01 % гентамицина сульфата

***⇒ содержит 0.03 % ProClin 300+0.015 % 5-бromo-5-нитро-1.3-диоксан (BND) + 0.010 % 2-метил-2Н-изотиазол-3-один (MIT).

4.1.1 Необходимые но не поставляемые материалы

- Микротитровальный планшетный калибровочный ридер (450/620нм +/- 10нм).
- Калибровочные микропипетки разного объема.
- Инкубатор на 37°C.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Вortexный трубчатый миксер.
- Таймер.
- Абсорбирующая бумага.

4.2 Хранение и стабильность набора

Реагенты стабильны до даты срока годности, указанной на этикетке при хранении при 2 - 8 °С.

Не использовать реагенты после окончания срока годности!

4.3 Подготовка реагентов

Перед использованием приведите все реагенты и необходимое количество стрипов к комнатной температуре.

Промывочный раствор

Развести промывочный раствор **1+19** (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий редистилированной водой. потребление: ~5 мл на определение

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °С на водяной бане. Стабильность после разведения: 4 недели при 2 ÷ 8 °С

5. Образцы

В данном исследовании может использоваться сыворотка.

Не рекомендуется использовать гемолитические, желтушные или липемические образцы.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Забрать кровь венепункцией (e.g Sarstedt Monovette # 02.1388.001), дать свернуться и отделить центрифугированием сыворотку при комнатной температуре.

5.2 Хранение образцов

Перед исследованием образцы должны храниться накрытыми в течение 24 часов при температуре 2-8°C. Образцы, хранящиеся в течение более долгого срока, перед исследованием необходимо замораживать только один раз при -20°C. Оттаявшие образцы перед исследованием необходимо несколько раз перевернуть.

5.3 Разведение образцов

Развести каждый образец пациента **1+100** раствором для разведения образцов, напр., 10 мкл образца + 1 мл раствора для разведения. Хорошо смешать, оставить на 15 минут, снова хорошо перемешать).

Примечание: Контроли готовы к использованию и их не надо разводить!

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

Внимательно прочитайте инструкцию перед выполнением анализа. Надежность результатов зависит от четкого следования инструкциям.

- **Перед использованием все реагенты довести до комнатной температуры.** Реагенты необходимо смешать без образования пены.
- Рекомендуется проводить процедуру непрерывно.

- Избегать контаминации реагентов, пипеток, и лунок/пробирок. Используйте новые одноразовые пластиковые наконечники для каждого реагента или образца.
- Абсорбция – функция инкубационного времени и температуры. Перед началом проведения процедуры рекомендуется подготовить все реагенты, извлечь крышки, установить лунки в держатель и т.д. Это обеспечит непрерывное проведение каждого шага пипетирования.
- Как правило, ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

Перед проведением анализа необходимо составить схему распределения и идентификации образцов и контролей с помощью формы вложенной в набор.

1. Отобрать требуемое количество микротитровальных стрипов или лунок и поместить их в держатель.

Разместите по меньшей мере:

- | | |
|------------------------|------------------------------|
| 1 лунка (напр., A1) | для бланка субстрата, |
| 1 лунка (напр., B1) | для отрицательного контроля, |
| 2 лунки (напр., C1+D1) | для Cut-off контроля и |
| 1 лунка (напр., E1) | для положительного контроля. |

На усмотрение пользователя можно ставить образцы и контроли в дублях.

2. Раскапать:

- 100 мкл **готового к употр.** отрицательного контроля в лунки B1,
- 100 мкл **готового к употр.** "cut-off" контроля в лунки C1+D1,
- 100 мкл **готового к употр.** положительного контроля в лунку E1 и
- 100 мкл **каждого разведенного** образца пациента с **новыми одноразовыми наконечниками** в оставшиеся лунки согласно схеме.

Оставить лунку A1 для бланка субстрата!

3. Накрыть лунки пленкой поставляемой в наборе. Инкубировать: **1 час при 37 °С.**

4. Резко вытряхните содержимое лунок. Промойте их **5 раз 300 мкл/лунку** рабочего промывочного раствора. В конце осторожно удалить остатки жидкости выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!

Примечание:

Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.

5. Раскапать **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки **кроме A1** и накрыть их пленкой.

6. Накрыть лунки пленкой. Инкубировать: **30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °С).** Не подвергать воздействию прямого солнечного света!

7. Повторить процедуру промывки как описано в этапе 4.

Примечание: осторожно удалить остатки жидкости выстучав стрипы на салфетку!

8. Раскапать **100 мкл** раствора субстрата **во все** лунки

9. Накрыть и инкубировать: **ровно 15 минут при комнатной температуре (20 ÷ 25 °С) в темноте.**

10. остановить ферментную реакцию путем внесения **100 мкл** стоп-раствора **в каждую** лунку. Любое голубое окрашивание проявившееся во время инкубации переходит в желтое.

Примечание: высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!

11. Читать оптическую плотность при **450/620 нм** с помощью микротитрационного планшетного ридера в течении **30 минут** после внесения стоп-раствора.

6.3 Измерение

Настроить микропланшетный ридер для ELISA на **ноль** используя **бланк субстрата в лунке A1.**

Если по техническим причинам ELISA ридер не может быть настроен на **ноль** используя бланк субстрат в лунке A1, вычитайте значение абсорбции лунки A1 из всех остальных значений абсорбции. **Измерить абсорбцию во всех лунках при 450 нм** и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в схему.

Двойная длина волны – рекомендуется считывать на 620 нм как референтной длине волны. Где применимо рассчитать среднее значение абсорбции всех дублей.

7. РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1 Надежность процесса анализа

Постановка анализа может считаться **действительной** при соблюдении следующих условий:

- **Бланк субстрата в A1**: ⇒ значение абсорбции менее **0.100.**
- **Отриц. контроль в C1**: ⇒ значение абсорбции менее **0.200.**
- **Cut-off контроль (CO) в C1/D1**: ⇒ значение абсорбции между **0.250-0,550.**

- **Положит. контроль in E1**: ⇒ значение абсорбции более **0.600.**

7.2 Вычисление

Среднее значение абсорбции "Cut-off" контроля [CO]

Рассчитать среднее значение абсорбции 2 определений негативных контролей (напр., в C1/D1).

Пример: (0.44 + 0.46) ÷ 2 = 0.45 = CO

7.3 Интерпретация

Средние значения абсорбции образцов пациента более чем на **10 % больше CO**
⇒ **ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

(Средние) значения абсорбции пациентов **от 10 % выше до 10 % ниже CO**
⇒ **серая зона ⇒ повторить анализ**

2 - 4 недели спустя – на новых пробах пациентов

результат второго анализа опять

в «серой зоне»
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

средние значения абсорбции пациента более чем на **10 % ниже CO**
⇒ **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗ-Т**

7.3.1 Результаты в DRG единицах [DU]

среднее значение абсорбции пациента x 10
_____ = [DRG UNITS = DU]

1.580 x 10

Пример: _____ = 35 DU

0.45

Интерпретация результатов

Значение Cut-off:	10	DU
Серая зона:	9 - 11	DU
Отрицательный:	< 9	DU
Положительный:	> 11	DU

Важное замечание для интерпретации результатов

Так как типы ВПГ 1 и 2 имеют очень сходные серотипы они показывают высокую степень кросс реакции.

Поэтому инфицирование одним серотипом ВПГ вызывает увеличение кол-ва антител другого, гетерологического серотипа.

По этой причине положительный результат на ВПГ 2 IgG сам по себе не является точным определением инфекции ВПГ-2!

Для определения серотипа вируса, которым был инфицирован пациент, образцы пациентов **должны исследоваться параллельно** используя наборы для детекции ВПГ типа 1 и типа 2.

Более высокая концентрация антител указывает на доминирующие антитела и определяет соответствующий серотип ВПГ.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com