

HSV IgM

ELISA test firmy Human na stanovení protilátek IgM proti Herpes simplex viru (HSV)

Balení

Obj.č. : 51126 96 testů kompletní souprava

Účel použití

HSV IgM ELISA test je určen pro detekci skupiny protilátek imunoglobulinu M (IgM) proti Herpes Simplex virus (HSV) v lidském séru. HSV infekce se objevují po celém světě. Inkubační doba po proniknutí viru do organismu je asi 1 týden (rozsah 2-26 dní). Klinické příznaky zahrnují herpes genitálie a labialis. HSV infekce u novorozenců (mladších 6 týdnů) je často zničující. Je-li neléčena, pak mortalita přesahuje 65%. Mnoho z těch, kteří přežijí, vykazuje vývojové vady. Infekce se objevuje nejběžněji při porodu, když novorozenec prochází infikovanými porodními cestami.

Princip -Klasická EIA-

HUMAN HSV IgM ELISA je klasická ELISA technika. Jamky v mikrotitrační destičce jako pevná fáze jsou potaženy HSV antigeny (HSV-Ag). V prvním kroku inkubace se odpovídající specifické protilátky (HSV-IgM-Ab) přítomné ve vzorcích navážou na ukotvené antigeny. Pufr na ředění vzorků obsahuje anti-lidské IgG, aby **zabránil interferenci revmatoidních faktorů (RF) a kompetici specifických IgG** přítomných ve vzorku. Na konci inkubace jsou nenavázané složky vymyty. Ve druhém kroku inkubace je přidán konjugát anti-IgM (konjugované anti-lidské IgM protilátky a peroxidasa), který se specificky váže na IgM protilátky, což má za následek vytvoření typických imunokomplexů. Po druhém promývacím kroku, kterým se vymyje přebytečný konjugát, je přidán TMB/Substrát (Krok 3). Po ukončení reakce se modrá barva změní na žlutou. Intenzita barev je přímo úměrná koncentraci HSV-IgM-Ab ve vzorku. Absorbance kalibrátorů a vzorků je stanovována destičkovým ELISA spektrofotometrem (HUMAREADER). Výsledky pro pacientův vzorek jsou získány porovnáváním s referenční hodnotou.

Reagencie a obsah balení

[MIC]	12	Mikrotitrační destičky (v jednodestičkovém držáku) (kód HSV M) 8-jamkové ulamovatelné řádky potažené HSV antigenem (typ 1 a 2)	
[NC]	2.5 ml	HSV IgM Negativní kontrola (zelené víčko) připraveno k použití, lidské	
[PC]	2.5 ml	HSV IgM Positivní kontrola (červené víčko) připraveno k použití, lidské	
[DIL-M]	100 ml	Ředící pufr IgM (modré víčko)	
<u>511</u>		připraveno k použití, <u>zelené</u>	pH 6.5 ± 0,2
		Fosfátový pufr	10 mmol/l
		NaCl	8 g/l
		Albumin	10 g/l
		Anti-lidské-IgG (kozí)	
[CON]	12 ml	Anti-IgM konjugát (bílé víčko) připraveno k použití, <u>červené</u>	
		Anti-lidské IgM (králičí), konjugované s peroxidasou	
[WS]	50 ml	Promývací roztok (bílé víčko)	
<u>512</u>		koncentrát pro asi 1000 ml	pH 7.2 ± 0,2
		Tris pufr	10 mmol/l
		NaCl	8 g/l
[SUB]	15 ml	Substrátová Reagencie (černé víčko)	
<u>513</u>		připraveno k použití, bezbarvé až modravé	pH 3.7 ± 0.2
		3,3', 5,5'-tetramethylbenzidin (TMB)	1.2 mmol/l
		Peroxid vodíku	3 mmol/l
[STOP]	15 ml	Ukončovací roztok (červené víčko)	
<u>514</u>		Kyselina sírová, připraveno k použití	0.5 mol/l
	2	Lepící pásky	

Konzervanty: Celková koncentrace <0,1%

Bezpečnostní poznámky

Nepolykejte reagentie. Zabraňte kontaktu s očima, kůží a sliznicemi. Se všemi vzorky a kontrolami se musí zacházet jako s potenciálně infekčními. Kontroly byly zkontrolovány na infekční hladinu HCV a HIV-1/2 protilátek a HBsAb a nalezeny negativními. Noste ochranné oblečení a jednorázové rukavice dle správné laboratorní praxe.

Všechny materiály kontaminované pacientovými vzorky nebo kontrolami musí být inaktivovány schválenými standardními postupy (autoklávováním nebo chemickou cestou) v souladu s platnými předpisy.

[STOP] dráždí oči, kůži a sliznice. Po kontaktu omývejte důkladně velkým a množstvím vody a konzultujte s lékařem.

Stabilita

Při skladování při teplotě 2 - 8 C jsou reagentie stabilní do vyznačeného data expirace.

Po otevření musí být reagentie použity do 60 dní. (viz Poznámky)

[MIC] (kód: HSV M)

- uzavřeno v hliníkovém obalu se sušidlem

- před otevřením musí mít pokojovou teplotu

- nepoužité: vraťte sušidlo zpět do obalu a skladujte při 2-8 C.

Nedotýkejte se horního okraje ani vnitřku jamek prsty!

Příprava reagentií

Zahřejte před použitím všechny reagentie na pokojovou teplotu (15-25 C). Nepoužívané reagentie by měly být skladovány vždy při 2-8 C

Poznámky

Nejdůležitější reagentie [DIL-M] 5111, [WS] 5102, [SUB] 5103, [STOP] 5104 jsou zaměnitelné mezi jednotlivými soupravami. Pro **IgM testy** používejte jen IgM ředící pufr [DIL-M].

Všechny ostatní reagentie jsou specifické pro individuální soupravy a nesmí být vzájemně zaměněny. Spolu s těmito reagentiemi nelze použít reagentie jiných výrobců.

Pracovní promývací roztok [WASH]

Zřed'te promývací roztok [WASH] v poměru 1 + 20 čerstvou deionizovanou vodou, např.

50 ml + 1000 ml = 1050 ml

Stabilita po zředění: 1 týden při 2 - 8 C.

Vzorky

Sérum

Nepoužívejte vysoce lipemické a hemolysované vzorky.

Vzorky je možné skladovat při 2-8 C 7 dní nebo déle při -20 C. **Zmrazujte a rozmrazujte pouze jednou.** Rozmražené vzorky musí být homogenizovány. Odstraňte částice centrifugací nebo filtrací.

Pracovní postup

Dodržujte postup přesně!

Poznámky k postupu

P1: Nezaměňujte víčka lahvíček (nebezpečí kontaminace). Nepoužívejte reagentie po jejich datu expirace.

P2: Nepoužívejte reagentie, které mohou být kontaminovány nebo vypadají či páchnou jinak než je obvyklé.

P3: Zaznamenávejte pečlivě vzorky a kontroly do formuláře dodávaného s kitem

P4: [MIC] – vyberte požadovaný počet stripů (řádek) destičky.

P5: Kontroly nechte probíhat vždy dvě vedle sebe. Pipetujte kontroly a vzorky přímo **na dno** mikrojamek.

P6: Vždy přidávejte reagentie v tomtéž pořadí, abyste minimalizovali rozdíly v reakčním čase mezi jamkami. Toto je důležité pro reprodukovatelné výsledky. Pipetování vzorků by nemělo překročit 5 minut. Jinak pipetujte kalibrační křivku v naznačených polohách v poločase série. Jestli se používá více než jedna destička, opakujte dávce odpovídající (kalibrační) křivku pro každou destičku.

P7: Odstraňte vzduchové bubliny před inkubací a odečítání absorbance.

P8: [SUB] – inkubujte ve tmě. [SUB] iniciuje kinetickou reakci, která je zakončena přidáním [STOP].

P9: [DIL-M] – zákal po přidání vzorku nemá žádný vliv na výsledky.

Promývací procedura

Promývací procedura je kritická. Nedostatečné promytí sníží přesnost nebo falešně zvýší absorbanci.

W1: Odstraňte lepicí pásky, vylijte obsah jamek do 5% roztoku chlornanu sodného a přidejte [WASH] do každé jamky, po 30 sekundách navlhčování vylijte a opakujte promytí

W2: V případě automatického promývání začněte s [WASH] a promyjte stripy 4x resp. 5x. Ujistěte se, že promývač úplně plní všechny jamky a účinně vylívá obsah po 30 sekundách (zbývající kapalina po vylití v jamce < 15ml).

W3: Po promytí odstraňte zbývající kapalina buničinou s destičky obrácené vzhůru nohama.

Pipetovací schéma

Reagencie a vzorky musí mít před použitím pokojovou teplotu.

Příprava vzorku:

Zřed'te pacientovo sérum 1+100 [DIL-M] 5111, např. 10 ml séra + 1 ml [DIL-M] 5111, důkladně promíchejte (viz P9)

Inkubujte zředěné vzorky nejméně 5 minut před dalšími kroky.

Zředěné vzorky lze skladovat při 2-8 °C 24 hod. před testováním

Kontroly jsou připraveny k použití.

Krok č.1	Jamky [ml]			
	A1 Slepý vzorek	B1/C1 [NC]	D1/E1 [PC]	F1... vzorek
[NC] dvakrát	--	100	--	--
[PC] dvakrát	--	--	100	--
Zředěné vzorky	--	--	--	100
[MIC] zalepte lepícím páskem				
Inkubujte 30 min při 17-25 °C				
Promyjte čtyřikrát jak je popsáno výše (W1-W3)				
[WASH]	350	350	350	350
Krok č.2				
[CON]	--	100	100	100
[MIC] zalepte lepícím páskem				
Inkubujte 30 min při 17-25 °C				
Promyjte 5x jak je popsáno (W1-W3)				
[WASH]	350	350	350	350
Krok č.3				
[SUB]	100	100	100	100
Inkubujte 15 min při 17-25 °C (viz P8)				
[STOP]	100	100	100	100
Pečlivě promíchejte.				
Vynulujte ELISA destičkový spektrofotometr (HUMAREADER) za použití slepého vzorku z jamky A1				
Změřte absorbanci při 450 nm hned jak je to možné nebo během 30 min. po ukončení reakce za použití referenčních vlnových délek 630-690 nm (je-li to možné)				

Výpočet kontrolních hodnot a cut-off hodnoty

1. Průměrná absorbance negativní kontroly v jamkách B1 a C1:

$$A_{450}(B1) + A_{450}(C1)$$

$$PNK = \frac{\text{-----}}{2}$$

2. Průměrná absorbance pozitivní kontroly v jamkách D1 a E1:

$$A_{450}(D1) + A_{450}(E1)$$

$$PPK = \frac{\text{-----}}{2}$$

3. Cut-off hodnota (**COH**) se získá následujícím vzorcem:

$$COH = PNK + 0,2 \times PPK$$

Test můžete považovat za platný, jsou-li splněna následující kritéria:

1. Slepá zkouška v jamce A1 < 0.150
2. PNK 0,250

3. PPK 0,400
4. PPK : PNK 3

Interpretace výsledků

A₄₅₀(pacient) COH + 15 % : **pozitivní** na IgM protilátky proti HSV

A₄₅₀(pacient) COH - 15 % : **negativní** na IgM protilátky proti HSV

Vzhledem k fyziologickým a analytickým variacím se výsledky testu ležící 15 % nad nebo pod cut-off hodnotou (COH) považují za neprůkazné. Doporučuje se změřit tyto vzorky paralelně s vzorky čerstvými, odebranými ve dvojici za 7 až 14 dní. Trend mezi hladinou specifických protilátek by měl být použit pro interpretaci, také by však měla být vzata v úvahu specifická IgG koncentrace (HUMAN ELISA IgG), pacientova minulost a další vyšetření. Opakovaně reaktivní a nejednoznačné vzorky mohou být podrobeny potvrzujícímu testu.

Díky reaktivaci latentních infekcí jinými viry spojenými s Herpesviridae rodinou, se můžou objevit pozitivní HSV IgM výsledky v sérech pacientů s takovými infekcemi. Možnost infekce jinými členy rodiny Herpesviridae by proto měla být prozkoumána ještě před interpretací výsledků.

V případě, že není k dispozici ELISA reader je možná vizuální interpretace výsledků.

- Slepý vzorek v jamce A1 by měl být bezbarvý
- Vzorky mohou být považovány za pozitivní, jestliže je barva jamky se vzorkem mnohem silnější než barva [NC] v jamkách B1/C1.

Parametry testu

Typické údaje o parametrech testu lze najít ve Verification Report na:

www.human.de/data/gb/vr/el-hsvm.pdf or

www.human-de.com/data/gb/vr/el-hsvm.pdf

Poznámka

Složky kitu jsou stabilní i po otevření až do data expirace. Avšak s počtem měření je přímo spojena potenciální kontaminace. 60 denní limit po prvním použití je zvolen z bezpečnostních důvodů

Používání kitů by mělo vždy vyhovovat správné laboratorní praxi (*). Vyhodnocovací kritéria musí být splněna!

(* To zahrnuje: Pečlivé uzavírání lahvíček správnými uzávěry/V případě, že reagentie mohou přijít do kontaktu s kontaminovanými roztoky jako jsou vzorky pacientů, používá se pouze nezbytné množství reagentů odebrané ze zásobních roztoků/Zásobní roztoky se vždy vrací do 2-8 °C, když se nepoužívají)

Literatura

1. Engvall, E., Perlmann, P., Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Quantitative assay for immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874 (1971)
2. Engvall, E., Perlmann, P., Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes, *J. Immunol.* 109, 129-135 (1972)
3. Remington, J.S., Klein, J.O., *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* Sanders, Philadelphia, London, Toronto (1976)
4. Bidwell, D.E. *et al.*, Enzyme-immunoassays for viral diseases. *J. Infect. Dis.* 136, Supplement 274-278 (1977)
5. Volk, W.A. *Essentials of Medical Microbiology.* Second ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia, New York, San Jose, Toronto, 574-576 (1982).

Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH

Max-Planck-Ring 21 - D-65205 Wiesbaden - Germany

Telefon: +49 6122 9988 0 - Telefax: +49 6122 9988 100 - eMail: human@human.de

EL-HSVM
INF 5112601 GB
06-2004-15

