

**VIROTECH HSV 1 (gG1) IgG/IgM ELISA
(HSV 1 (gG1) IgG/IgM ELISA)**

Nr zamówienia: EC130.00 Kod barwny: czerwony/czarny

HSV 1 (gG1) IgG Liquor/CSF Standards

Nr zamówienia: EC130L60

**VIROTECH HSV 2 (gG2) IgG/IgM ELISA
(HSV 2 (gG2) IgG/IgM ELISA)**

Nr zamówienia: EC131.00 Kod barwny: czerwony/ciemnoniebieski

HSV 2 (gG2) IgG Liquor/CSF Standards

Nr zamówienia: EC131L60

TYLKO DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Treść

1. Cel zastosowania	3
2. Zasada badania	3
3. Zawartość opakowania IgG / IgM	3
4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników.....	3
5. Środki ostrożności i ostrzeżenia	4
6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie).....	4
7. Wykonanie badania.....	4
7.1 Materiał do badań	4
7.2 Przygotowanie odczynników	4
7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA.....	5
7.4 Zastosowanie aparatury ELISA.....	5
8. Ocena wyników badania	5
8.1 Kontrola badania.....	6
8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE).....	6
8.3 Schemat oceny IgG i IgM.....	6
8.4 Ograniczenia testu	6
9. Literatura.....	6
10. Schemat przebiegu badania	8

1. Cel zastosowania

Testy VIROTECH HSV 1 (gG1) IgG/IgM ELISA i VIROTECH HSV 2 (gG2) IgG/IgM ELISA służą do ilościowego i jakościowego oznaczania swoistych przeciwciał IgG/IgM przeciw wirusowi opryszczki zwykłej (*Herpes simplex Virus*, HSV) w surowicy ludzkiej.

Serologia nadaje się wyłącznie do określenia stanu immunologicznego oraz do wykluczenia obecności wirusa opryszczki (Herpes). Zastosowanie specyficznych dla danego typu glikoprotein G, gG1 lub gG2 umożliwia rozróżnienie między HSV 1 i HSV 2 w celu określenia seroprevalencji, a także w celu identyfikacji potencjalnych przenosicieli wirusa.

Wyniku IgM nie wolno oceniać odrębnie od wyniku IgG.

Diagnozę opryszczki narządów rodnych należy potwierdzić oznaczeniem czynnika zakaźnego.

Ponieważ w momencie urodzin układ immunologiczny noworodka nie jest jeszcze całkowicie rozwinięty, serologia nie jest odpowiednia do wykrycia opryszczki noworodków, może być jednak zastosowana retrospektywnie do pomiaru przekazywanych przez łożysko przeciwciał IgG przeciw HSV 2.

2. Zasada badania

Znakowane w surowicy ludzkiej przeciwciała tworzy razem z umieszczonym na mikropłytkę antygenem kompleks immunologiczny. Niezwiązane immunoglobuliny są usuwane w procesach płukania. Z kompleksem tym łączy się koniugat enzymu. Niezwiązane immunoglobuliny są następnie usuwane w procesach płukania. Po dodaniu roztworu substratu (TMB) w wyniku aktywności enzymów (peroksydaza) powstaje niebieski barwnik, który po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję zabarwia się na żółto.

3. Zawartość opakowania IgG / IgM

1. **1 mikropłytkę**, składającą się z 96 łamliwych dołków opłaszczonych antygenami, liofilizowanych
2. **bufor do rozcieńczania PBS (niebieski, gotowy do użycia) 2x50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
3. **roztwór do płukania PBS (20x stężony) 50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
4. **IgG kontrola negatywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
5. **IgG kontrola cut-off, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
6. **IgG kontrola pozytywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
7. **IgM kontrola negatywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
8. **IgM kontrola cut-off, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
9. **IgM kontrola pozytywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
10. **koniugat IgG (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzanowej ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi i w buforze Tris, gotowy do użycia
11. **koniugat IgM (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzanowej z FCS i środkami konserwującymi w buforze Tris, gotowy do użycia
12. **tetrametylobenzydyna – roztwór substratu (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gotowy do użycia
13. **roztwór zatrzymujący reakcje na bazie cytrynianu, 6 ml**, zawiera mieszanę kwasów

4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników

Zestaw testowy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Okres trwałości poszczególnych komponentów jest zaznaczony na odpowiedniej etykiecie, okres trwałości zestawu patrz certyfikat kontroli jakości.

1. Po pobraniu wymaganych pojedynczych zagłębień pozostałe pojedyncze dołki/paski przechowywać w zamkniętym woreczku z osuszaczami w temperaturze 2-8°C. Odczynniki natychmiast po użyciu przechowywać ponownie w temperaturze 2-8°C.
2. Gotowy do użycia koniugat oraz roztwór substratu TMB są wrażliwe na światło i muszą być przechowywane w ciemności. Jeżeli po dostaniu się światła dojdzie do przebarwienia roztworu substratu, należy go wyrzucić.
3. Wyjąć tylko potrzebną do testu ilość gotowego do użycia koniugatu lub TMB. Nadmiar wyjętego koniugatu lub TMB nie może być z powrotem odłożony, lecz należy go usunąć.

Material	Stan	Przechowywanie	Trwałość
Próbki	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	max. 6 h
	bez rozcieńczenia	+2 do +8°C	1 tydzień

Kontrole	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Płytki mikrotitracyjna	po otwarciu	+2 do +8° (przechowywanie w dostarczonej torebce z osuszaczem)	3 miesiące
Absorbent czynnika reumatoidalnego	bez rozcieńczenia, po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	1 tydzień
Koniugat	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Tetrametylobenzzydina (TMB)	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Roztwór zatrzymujący reakcje	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Roztwór do płukania	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	+2 do +25°C	4 tygodnie

5. Środki ostrożności i ostrzeżenia

1. Jako surowice kontrolne stosowane są tylko te surowice, które były przebadane i uzyskały wynik negatywny na przeciwciała HIV1, HIV2, HCV i antygen powierzchniowy wirusa Hepatitis B. Wszystkie próbki, rozcieńczone próbki, kontrole, koniugaty i mikropaski do miareczkowania należy mimo to traktować jako materiał potencjalnie zakaźny i obchodzić się z nimi odpowiednio ostrożnie. Obowiązują odpowiednie wytyczne dotyczące prac laboratoryjnych.
2. Komponenty zawierające środki konserwujące, roztwór zatrzymujący reakcję na bazie cytrynianu i TMB podrażniają skórę, oczy i błony śluzowe. W przypadku kontaktu należy natychmiast przemyć dane miejsca ciała bieżącą wodą i ewentualnie pójść do lekarza.
3. Usuwanie zużytych materiałów następuje zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym kraju.

6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie)

1. woda destylowana/demin.
2. pipety wielokanałowe 50µl, 100µl
3. mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
4. probówki
5. chusty z masy celulozowej
6. przykrywka płytek ELISA
7. pojemnik do usuwania materiałów zakaźnych
8. ręczna płuczka ELISA lub automatyczna płuczka mikropłytek
9. spektrofotometr do odczytu mikropłytek z filtrem 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm)
10. inkubator

7. Wykonanie badania

Dokładne przestrzeganie przepisów roboczych VIROTECH Diagnostics jest warunkiem uzyskania prawidłowych wyników.

7.1 Materiał do badań

Jako materiał badawczy można zastosować surowicę i osocze (przy tym nie ma znaczenia rodzaj antykoagulantów), nawet jeśli w ulotce informacyjnej wymieniona jest tylko surowica.

Rozcieńczone próbki od pacjentów muszą być zawsze świeże podczas zastosowania.

W celu dłuższego przechowywania surowice muszą być zamrożone. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania.

1. Stosować tylko świeże, niedezaktywowane surowice.
2. Nie stosować próbek hiperlipemicznych, hemolitycznych, mikrobiologicznie zanieczyszczonych oraz mętnych surowic (fałszywie pozytywne/negatywne wyniki).

7.2 Przygotowanie odczynników

Diagnostyka Systemowa VIROTECH Diagnostics oferuje duży stopień elastyczności poprzez możliwość zastosowania buforu do rozcieńczania i płukania, TMB, roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu oraz koniugatu niezależnie od parametrów i serii. Gotowe do użycia kontrole (kontrola pozytywna, kontrola cut-off, kontrola negatywna) należy stosować swoicie dla parametrów i wyłącznie z serią płytek podaną w certyfikacie kontroli jakościowej.

14. Ustawić inkubator na temperaturę 37°C i przed rozpoczęciem inkubacji sprawdzić, czy osiągnięto daną temperaturę.
15. Wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej, dopiero wtedy otworzyć opakowanie z paskami testowymi.
16. Wszystkie płynne komponenty należy dobrze wymieszać przed użyciem.
17. Koncentrat roztworu do płukania dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demineralizowaną (w przypadku ewentualnej krystalizacji koncentratu należy przed rozcieńczeniem doprowadzić go do temperatury pokojowej i przed użyciem dobrze wstrząsnąć).
18. Wysokie miana IgG lub czynniki reumatoidalne (RF) mogą zaburzyć specyficzne oznaczenie przeciwciał IgM oraz prowadzić do fałszywie pozytywnych lub fałszywie negatywnych wyników. **Surowice potraktować wstępnie RF-SorboTech** (adsorbentem firmy VIROTECH). W kontrolach IgM nie ma wstępnej adsorpcji.

7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA

1. Na jedną próbę odpipetować po 100µl gotowego do użycia buforu do rozcieńczania (ślepa próba), kontroli negatywnej, kontroli cut-off i pozytywnej kontroli IgG i IgM oraz rozcieńczonych surowic pacjentów. Zalecamy za każdym razem podwójne oznaczenie (ślepa próba, kontrole i surowice pacjentów), w kontroli cut-off podwójne oznaczenie jest obowiązkowo konieczne. Rozcieńczenie robocze surowic pacjentów: 1+100; np. 10µl surowicy + 1ml buforu do rozcieńczania.
2. Po pipetowaniu następuje inkubacja przez 30 min w temperaturze 37 °C (z przykryciem).
3. Zakończenie okresu inkubacji poprzez 4-krotne płukanie, każdorazowo 350-400 µl roztworu do płukania na dołek. Nie pozostawiać roztworu do płukania w dołkach, lecz usunąć pozostałości płynu poprzez wystukanie na podłoże z waty celulozowej.
4. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia koniugatu do wszystkich dołków.
5. Inkubacja z koniugatem: 30 min. w temperaturze 37°C (z przykryciem).
6. Zakończenie inkubacji z koniugatem poprzez 4-krotne płukanie (patrz pkt 3).
7. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia roztworu substratu TMB do każdego dołka.
8. Inkubacja roztworu substratu: 30 min w temperaturze 37°C (z przykryciem, w ciemności).
9. Zatrzymanie reakcji substratu: do wszystkich dołków dodać pipetami po 50µl roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu. Ostrożnie i dokładnie wstrząsnąć płytką, aż płyny całkowicie się wymieszają i widoczny będzie jednorodnie żółty kolor.
10. Dokonać pomiaru ekstynkcji przy 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm). Ustawić tak fotometr, żeby zmierzona ślepa próba była odliczona od wszystkich pozostałych ekstynkcji. Pomiar fotometryczny powinien być przeprowadzony w ciągu godziny po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję.

Schemat przebiegu badania patrz ostatnia strona

7.4 Zastosowanie aparatury ELISA

Wszystkie testy VIROTECH Diagnostics ELISA mogą być przetwarzane za pomocą aparatów ELISA. Użytkownik jest zobowiązany do regularnego przeprowadzania walidacji urządzeń.

VIROTECH Diagnostics zaleca następujące postępowanie:

1. Przy nastawianiu urządzenia lub większych naprawach aparatów ELISA firma VIROTECH Diagnostics zaleca przeprowadzenie walidacji urządzenia zgodnie z wytycznymi producenta urządzenia.
2. Zaleca się następnie sprawdzenie aparatu ELISA za pomocą zestawu do walidacji (EC250.00). Regularne sprawdzanie zestawem do walidacji powinno być przeprowadzane przynajmniej raz na kwartał.
3. Podczas każdego testu muszą być spełnione zezwalające kryteria zawarte w certyfikacie kontroli jakości produktu. Takie postępowanie gwarantuje nienaganne działanie aparatu ELISA i służy ponadto do zapewnienia jakości pracy laboratorium.

8. Ocena wyników badania

Gotowe do użycia kontrole służą do półilościowego oznakowania specyficznych przeciwciał IgG i IgM, których stężenie jest podawane w Jednostkach VIROTECH (=VE). Odchylenia uwarunkowane przeprowadzeniem badania są wyrównywane metodą obliczeniową i dzięki temu osiągana jest duża odtwarzalność. W celu obliczenia VE stosowane są średnie wartości OD.

8.1 Kontrola badania

a) wartości OD (gęstości optycznej)

Wartość OD ślepej próby powinna wynosić <0,15.

Wartości OD kontroli negatywnej powinny być mniejsze od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości, a wartości OD kontroli pozytywnej powinny być większe od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości.

b) Jednostki VIROTECH (VE)

Jednostki VIROTECH (VE) kontroli cut-off są zdefiniowane jako 10 VE. Obliczone VE kontroli pozytywnych powinny znajdować się w przedziale podanym w certyfikacie kontroli jakości.

Jeżeli wymagania (wartości OD, VE) nie są spełnione, należy powtórzyć test.

8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE)

Ekstynkcja próby ślepej (450/620nm) musi być odliczona od wszystkich ekstynkcji.

$$\begin{aligned} \text{VE (kontrola pozytywna)} &= \frac{\text{OD (kontrola pozytywna)}}{\text{OD (kontrola cut - off)}} \times 10 \\ \text{VE (surowica pacjenta)} &= \frac{\text{OD (surowica pacjenta)}}{\text{OD (kontrola cut - off)}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Schemat oceny IgG i IgM

Wynik (VE)	Ocena
< 9,0	negatywne
9,0 - 11,0	wartości graniczne
> 11,0	pozytywne

1. Jeżeli zmierzone jednostki VE próbki są wyższe od zakresu granicznego, to próbki te są traktowane jako pozytywne.
2. Jeżeli zmierzone jednostki VE znajdują się w podanym zakresie granicznym, nie występuje znamienne duże stężenie przeciwciał, próbki są traktowane jako wartości graniczne. W celu pewnego stwierdzenia zakażenia konieczne jest oznaczenie zawartości przeciwciał dwóch próbek surowicy. Jedna próbka surowicy powinna być zbadana bezpośrednio na początku zakażenia, a druga próbka po 5-10 dniach (surowica rekonwalescencyjna). Stężenie przeciwciał obydwóch próbek musi być oznaczane równolegle, to znaczy w jednym badaniu. Nie jest możliwa prawidłowa diagnoza na podstawie oceny pojedynczej próbki surowicy.
3. Jeżeli zmierzone wartości są niższe od zdefiniowanego zakresu granicznego, w próbce nie występują dające się zmierzyć swoiste dla antygenów przeciwciała. Probki są traktowane jako negatywne.
4. W przypadku pozytywnego wyniku IgM zaleca się sprawdzenie wyniku za pomocą PCR.

8.4 Ograniczenia testu

1. Interpretacja wyników serologicznych powinna zawsze uwzględniać obraz kliniczny, dane epidemiologiczne oraz ewentualnie dalsze będące do dyspozycji wyniki laboratoryjne.
2. Mimo wszystkich zalet testu gG2 istnieją również wskazówki dotyczące ograniczenia testu. Z jednej strony leczenie acyklowirem może mieć wpływ na tworzenie przeciwciał (3), a z drugiej strony zmienność genetyczna białka gG2 może prowadzić do szczepów HSV2 negatywnych na gG2.

9. Literatura

1. Anzivino, E, D Fioriti, M Mischitelli, A Bellizzi, V Barucca, F Chiarini, V Pietropaolo. 2009. Herpes simplex virus infection in pregnancy and in neonate: status of art of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention. Virol J. 6,40
2. Arvin, A, C Prober. 1995. Herpes Simplex Viruses. 876-883. In Murray, P, E Baron, M Pfaller, F Tenover, and R Tenover (eds.). Manual of Clinical Microbiology. 6th Ed. ASM, Washington, D.C.

3. Bernstein, DI, LR Stanberry, CJ Harrison, JC Kappes, MG Myers. 1986. Antibody response, recurrence patterns and subsequent herpes simplex virus type 2 (HSV-2) re-infection following initial HSV-2 infection of guinea-pigs: effects of acyclovir. *J Gen Virol.* 67, 1601-1612
4. Brown ZA, Benedetti J, Ashley R, Burchett S, Selke S, Berry S, Vontver LA, Corey L.. 1991. Neonatal herpes simplex virus infection in relation to asymptomatic maternal infection at the time of labor. *N Engl J Med.* 324, 1247-1252
5. Brown, Z, S Sleke, J Zeh, J Kopelmann, A Maslow, R Ashley, D Watts, S Berry, M Herd, L Correy. 1997. The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy. *N Engl J Med.* 337, 509-515
6. Bünzli, D, Wietlisbach V, Barazzoni F, Sähli R, Meylan PR. 2004. Seroepidemiology of Herpes Simplex virus type 1 and 2 in Western and Southern Switzerland in adults aged 25–74 in 1992–93 : a population-based study. *BMC Infect Dis.* 4. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/4/10>
7. CDC. 1998. Guidelines for Treatment of Sexually Transmitted Diseases. *MMWR.* 47, 1-118
8. Gerit Korr, Michael Thamm, Irina Czogiel, Christina Poethko-Mueller, Viviane Bremer and Klaus Jansen. 2017. Decreasing seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Germany leaves many people susceptible to genital infection: time to raise awareness and enhance control. Korr et al. *BMC Infectious Diseases* (2017) 17:471
9. Prober, C, W Sullender, L Yasukawa, D Au, A Yaeger, A Arvin. 1987. Low risk if herpes simplex virus infections in neonates exposed to the virus at the time of vaginal delivery to mothers with recurrent herpes simplex virus infections. *N Engl J Med.* 316, 240-244
10. Rabenau HF, Buxbaum S, Preiser W, Weber B, Doerr HW. 2002. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and type 2 in the Frankfurt am Main area, Germany. *Med Microbiol Immunol.* 190, 153-160
11. Roizman, B, DM Knipe. 2001. Herpes Simplex Viruses and Their Replication. . In Fields, B, D Knipe, P Howley, et al. (eds.). *Fields Virology 4th Ed.* Lippincott-Raven, Philadelphia
12. Smith J, N Robinson. 2002, Age-specific prevalence of infection with herpes simplex : a global review. *J Inf Dis.* 186, 3-28
13. Tunbäck, P, Bergström T, Claesson BA, Carlsson RM, Löwhagen GB. 2007. Early acquisition of herpes simplex virus type 1 antibodies in children-A longitudinal serological study. *J Clin Vir.* 40, 26-30
14. Whitley, R. 2001. Herpes Simplex Viruses. In Fields, B, D Knipe, P Howley, et al. (eds.). *Fields Virology 4th Ed.* Lippincott-Raven, Philadelphia
15. Wutzler, P, Doerr HW, Färber I, Eichhorn U, Helbig B, Sauerbrei A, Brandstädt A, Rabenau HF. 2000. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in selected German populations - relevance for the incidence of genital herpes. *J Med Virol.* 61, 201-207
16. Sauerbrei A. 2016. Herpes Genitalis: Diagnosis, treatment and Prevention. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2016 Dec;76(12):1310-1317. doi: 10.1055/s-0042-116494. Epub 2016 Oct 18. Review.

Przygotowanie próbek pacjentów i roztworu do płukania

▼ **Roztwór do płukania:** Koncentrat dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demin.

▼ **Rozcieńczenie próbki IgG w stosunku 1:101** ▼ **Rozcieńczenie próbki IgM w stosunku 1:101**
Adsorpcja czynnika reumatoidalnego za pomocą RF-SorboTech

np.:

10 µl surowicy/osocza + 1000 µl buforu do rozcieńczania
(Roztwór do rozcieńczania surowicy jest gotowy do użycia)

np.:

5 µl surowicy/osocza + 450 µl buforu do rozcieńczania +
1 kroplę RF SorboTech inkubować przez 15 min w temp.
pok.

Wykonanie badania

Inkubacja próbek

30 minut w temperaturze
37°C.

100 µl próbek pacjentów

Próba ślepa (bufor do rozcieńczania) i
kontrole

4x płukanie

400 µl roztworu do płukania

dobrze wytrząsnąć

Inkubacja
koniugatu

30 minut w temperaturze
37°C.

100 µl koniugatu

IgG, IgM

4x płukanie

400 µl roztworu do płukania

dobrze wytrząsnąć

Inkubacja substratu

30 minut w temperaturze
37°C.

100 µl substratu

Zatrzymanie

**50 µl roztworu do
zatrzymania reakcji**

ostrożnie wstrząsnąć

Pomiar ekstynkcji

Fotometr przy 450/620nm
(referencyjna długość fali 620-
690nm)