

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

Obj. l'.: EC130.00 Farebné kódovanie: l'ervené/l'ierne

HSV 1 (gG1) IgG Liquor/CSF Standards

Obj. l'.: EC130L60

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

Obj. l'.: EC131.00 Farebné kódovanie: l'ervené/tmavomodré

HSV 2 (gG2) IgG Liquor/CSF Standards

Obj. l'.: EC131L60

POUŽÍVAŠ LEN PRE DIAGNOSTIKU IN VITRO

VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim

Tel.: +49-6142-6909-0

Fax: +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Freigabedatum: 29.10.2019 13:03

REV 4 / VIROTECH HSV 1 (gG1) / HSV 2 (gG2) IgG/IgM ELISA SK

Obsah

1. Účel použitia.....	3
2. Princíp testu	3
3. Obsah balenia.....	3
3.1 Testovacia súprava IgG/IgM	3
4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensí pripravených na použitie	3
5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia.....	4
6. Načítanie potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky).....	4
7. Vykonanie testu.....	4
7.1 Vyčistený materiál	4
7.2 Príprava reagensí	5
7.3 Vykonanie testu VIROTECH ELISA	5
7.4 Použitie procesorov ELISA	5
8. Vyhodnotenie testu	6
8.1 Kontrola fungovania testu	6
8.2 Výpočet jednotiek VIROTECH (VE).....	6
8.3 Schéma vyhodnotenia IgG a IgM.....	6
8.4 Hranice testu.....	6
9. Literatúra	7
10. Schéma priebehu testu	8

1. Účel použitia

Test VIROTECH HSV1 (gG1) IgG/IgM ELISA, resp. VIROTECH HSV2 (gG2) IgG/IgM ELISA je určený na semikvantitatívne a kvalitatívne stanovenie špecifických protilátok IgG/IgM proti *Herpes simplex virus* (HSV) v ľudskom sére.

Sérológia je vhodná len pre stanovenie imunitného stavu a pre vylúčenie herpesu. Použitie typovo špecifických glykoproteínov G₁, gG1 príp. gG2, umožňuje diferenciáciu medzi HSV 1 a HSV 2 na určenie séroprevallencie, ako aj na identifikáciu potenciálnych prenášačov vírusu.

Výsledok IgM sa nesmie posudzovať izolovane od výsledku IgG.

Diagnóza herpesu genitálií sa musí zabezpečiť dôkazom pôvodcu ochorenia.

Keďže v ľase pôrodu nie je imunitný systém kojenca ešte úplne vyvinutý, sérológia nie je vhodná na dokazovanie novorodeneckého herpesu, no môže sa použiť retrospektívne na meranie transplacentárne prenesených anti-HSV 2 protilátok IgG..

2. Princíp testu

Protilátka hľadaná v ľudskom sére tvorí s antigénom fixovaným na mikrotitrálnej doske imunitný komplex. Neviazané imunoglobulíny sa odstránia opakovaným premývaním. S týmto komplexom sa spája enzýmový konjugát. Neviazané imunoglobulíny sa opäť odstránia premývaním. Po pridaní roztoku substrátu (TMB) vznikne v dôsledku enzymatickej aktivity (peroxidáza) modré farbivo, ktoré po pridaní zastavovacieho roztoku sa premení naľto.

3. Obsah balenia

3.1 Testovacia súprava IgG/IgM

1. **1 mikrotitrálna doska** pozostávajúca z 96 odlomiteľných jamiek, ktoré sú potiahnuté lyofilizovaným antigénom,
2. **riediaci pufer PBS (modrý, pripravený na použitie) 2 x 50 ml**, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a Tween 20
3. **premývací roztok PBS (koncentrovaný 20 x) 50 ml**, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a Tween 20
4. **IgG negatívne kontrolné sérum, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravený na použitie
5. **IgG kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
6. **IgG pozitívne kontrolné sérum, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
7. **IgM negatívne kontrolné sérum, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
8. **IgM kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
9. **IgM pozitívne kontrolné sérum, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
10. **IgG konjugát (antihumánny), 11 ml**, (ovčie alebo kozie) - konjugát chrenovej peroxidázy s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom v pufrí Tris, pripravený na použitie
11. **IgM konjugát (antihumánny), 11 ml**, (ovčie alebo kozie) - konjugát chrenovej peroxidázy s FCS (fetálnym teľacím sérom) a konzervačným prostriedkom v Tris pufrí, pripravený na použitie
12. **Tetrametylbendidín - roztok substrátu (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, pripravený na použitie
13. **Zastavovací roztok citrónanu, 6 ml**, obsahuje zmes kyselín

4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensí pripravených na použitie

Testovaciu súpravu uchovávať pri 2-8 °C. Trvanlivosť jednotlivých zložiek je uvedená na príslušných štítkoch, trvanlivosť súpravy pozri na certifikáte kontroly kvality.

1. Po odbere jednotlivých potrebných jamiek uskladnite zvyšné jednotlivé jamky/prúžky v uzavretom vrecku s pohlcovačom vlhkosti pri 2-8 °C. Reagencie ihneď po použití znovu skladujte pri 2-8 °C.
2. Konjugát pripravený na použitie a roztok substrátu TMB sú citlivé na svetlo a musia sa uchovávať v tme. Ak sa v dôsledku dopadu svetla roztok substrátu sfarbí, musí sa zlikvidovať.

3. Z konjugátu pripraveného na použitie, resp. TMB odoberte len množstvo potrebné pre vykonanie testu. Nadbytok odobratého konjugátu, resp. TMB sa nesmie vrátiť späť, ale musí sa zahodiť.

Materiál	Stav	Skladovanie	Trvanlivosť
Skúšobné vzorky	Zriedené	+2 až +8 °C	max. 6 h
	Nezriedené	+2 až +8 °C	1 týždeň
Kontrolné roztoky	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Mikrotitraľná platňa	po otvorení	+2 až +8 °C (skladovanie s dodávaným vakom s hydrofóbnym adsorbentom)	3 mesiace
RF absorbent	nezriedené, po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
	Zriedený	+2 až +8 °C	1 týždeň
Konjugát	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Tetrametylbenzidín (TMB)	po otvorení	+2 až +8 °C (chránený pred svetlom)	3 mesiace
Zastavovací roztok	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Premývací roztok	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
	finálne zriedený roztok (pripravený na použitie)	+2 až +25 °C	4 týždne

5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia

1. Ako kontrolné séra sa používajú len také séra, ktoré boli testované a pri testovaní na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK a povrchový antigén hepatitídy-B boli uznané za negatívne. Napriek tomu je nutné vziať vzorky, zriedené vzorky, kontrolné roztoky, konjugáty a mikrotitraľné príslušenstvo za potenciálne infekčný materiál a manipulovať s nimi s primeranou opatrnosťou. Platia príslušné smernice pre laboratórne práce.
2. Zložky, ktoré obsahujú konzervačný prostriedok, zastavovací roztok citrónanu a TMB, pôsobia dráždivo na pokožku, oči a sliznice. V prípade kontaktu je nutné postihnuté miesta na tele ihneď umyť veľkým množstvom vody a prípadne vyhľadať lekára.
3. Likvidácia použitých materiálov sa uskutočňuje podľa osobitných predpisov jednotlivých krajín.

6. Potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky)

1. Destilovaná/demineralizovaná voda
2. Viackanálová pipeta 50 µl, 100 µl
3. Mikropipety: 10 µl, 100 µl, 1000 µl
4. Skúmavky
5. Rúgok z buníliny
6. Kryt platní ELISA
7. Odpadový kontajner pre infekčný materiál
8. Umývačka rúk ELISA a automatická premývačka mikrotitraľných platní
9. Spektrofotometer pre mikrotitraľné platne so 450/620 nm filtrom (referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm)
10. Inkubátor

7. Vykonanie testu

Predpokladom pre dosiahnutie správnych výsledkov je exaktné dodržiavanie pracovného predpisu firmy VIROTECH Diagnostics.

7.1 Vyšetrený materiál

Ako skúšobnú vzorku možno použiť sérum a plazmu (druh antikoagulantu tu nehrá úlohu), aj keď v tomto príbalovom letáku sa spomína len sérum.

Nariadenia vzoriek pacientov sa musia použiť vždy prvé.

V prípade dlhšieho uloženia sa séra musia zmraziť. Viackrátové rozmrazovanie je neprípustné.

1. Používajte len prvé, nie neaktivované (pokojové) séra.
2. Nepoužívajte hyperlipemické, hemolytické, mikrobiálne kontaminované vzorky a zakalené séra (poskytujú nesprávne pozitívne/negatívne výsledky).

7.2 Príprava reagensií

Diagnostický systém VIROTECH Diagnostics poskytuje vysokú mieru flexibility tým, že umožňuje použiť riediaci a premývací pufer, zastavovací roztok citrónanu a TMB, ako aj konjugát pri presiahnutí parametrov a farby. Kontrolné roztoky pripravené na použitie (pozitívne kontrolné séra s hodnotou odstrihnutia - cut-off, negatívne kontrolné séra) sa musia použiť podľa špecifických parametrov a výhradne s platňou, ktorej farba je uvedená v certifikáte kontroly kvality.

14. Nastavte inkubátor na 37 °C a pred začiatkom inkubácie sa presvedčte o dosiahnutí nastavenej teploty.
15. Všetky reagensie zohrejte na teplotu miestnosti, až potom otvorte balenie s testovacími príčkami.
16. Všetky tekuté komponenty pred použitím dobre potrasť.
17. Koncentrát premývacieho roztoku doplňte na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou (v prípade, že sa v koncentráte tvoria kryštáliky, uveďte ho, prosím, pred zriedením na teplotu miestnosti a pred použitím ním dobre potrasť).
18. Vysoké IgG titre alebo reumatické faktory môžu rušiť špecifický dôkaz protilátok IgM a viesť k nesprávnemu pozitívnemu alebo negatívnemu výsledkom. **Pre správne stanovenie IgM je preto nutné séra vopred ošetriť prípravkom RF SorboTech** (adsorpčný prostriedok firmy VIROTECH). Pri kontrolných sérach IgM táto predadsorpcia odpadá.

7.3 Vykonanie testu VIROTECH ELISA

1. Pre každú predprípravu testu napipetujte po 100 µl riediaceho pufru pripraveného na použitie (slepý pokus), negatívnych, cut-off a pozitívnych kontrolných roztokov IgG a IgM, ako aj nariadených sér pacientov. Odporúčame vždy dvojité sadu testovaných vzoriek (blank, kontrolné roztoky a séra pacientov), pri kontrolnom roztoku cut-off je dvojitá sada naliehavo potrebná. Pracovné nariadenie sér pacientov 1 + 100, napr. 10 µl séra + 1 ml riediaceho pufru.
2. Po napipetovaní nasleduje inkubácia 30 min pri 37 °C (s krytom).
3. Inkubačný cyklus ukončíte 4-násobným premývaním, pričom zakaždým použijete 350-400 µl premývacieho roztoku. Premývací roztok nenechajte stáť v jamkách, ale odstráňte jeho posledné zvyšky vyklopaním na buniťinovú podklad.
4. Do všetkých jamiek napipetujte 100 µl konjugátu pripraveného na priame použitie.
5. Konjugáty inkubujte 30 min. pri 37 °C (prikryté).
6. Inkubáciu konjugátu ukončíte 4-násobným premytím (pozri bod 3).
7. Napipetujte do každej jamky 100 µl substrátového roztoku TMB, pripraveného na priame použitie.
8. Substrátový roztok inkubujte 30 min. pri 37 °C (prikrytý, v temnej miestnosti).
9. Reakciu substrátu ukončíte napipetovaním 50 µl zastavovacieho roztoku citrónanu do každej jamky. Dosku opatrne a dôkladne potrasť, až kým sa tekutiny celkom nepremiešajú a kým nie je vidieť jednotné hlté sfarbenie.
10. Extinkcie merajte pri 450/620 nm (referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm). Fotometer nastavte tak, aby nameraná hodnota slepého pokusu sa odpočítala od všetkých ostatných extinkcií. Fotometrické meranie sa musí uskutočniť do jednej hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

Priebehovú schému testu pozri na poslednej strane.

7.4 Použitie procesorov ELISA

Všetky testy ELISA firmy VIROTECH Diagnostics sa môžu vykonať pomocou procesorov ELISA. Používateľ je povinný prístroj pravidelne validovať.

VIROTECH Diagnostics odporúča nasledujúci postup:

1. Pri nastavení prístroja, resp. veľkých opravách váhového procesora ELISA odporúča firma VIROTECH Diagnostics validáciu prístroja podľa predlôh výrobcu prístroja.
2. Odporúča sa procesor ELISA následne vyskúšať pomocou validačnej súpravy (EC250.00). Toto pravidelné preskúvanie pomocou validačnej súpravy by sa malo vykonať najmenej raz za štvrtroka.
3. Pri každom testovacom behu sa musia splniť kritériá pre uvoľnenie do distribúcie uvedené v certifikáte kontroly kvality, ktorý bol vystavený k danému produktu.

Tento postup zabezpečí uje bezchybnú funkciu váhového procesora ELISA a okrem toho slúži k zabezpečeniu kvality laboratória.

8. Vyhodnotenie testu

Kontrolné roztoky pripravené na použitie slúžia k semikvantitatívnemu stanoveniu špecifických protilátok IgG, IgA a IgM, ktorých koncentrácia je uvedená v jednotkách VIROTECH - "VIROTECH Einheiten" (= VE). Vykonaním testu sa podmienené odchýlky metódou výpočtu vyrovnávajú, čím sa dosiahne vysoká reprodukovateľnosť. Pri výpočte VE sa používajú priemerné hodnoty OD (optickej hustoty).

8.1 Kontrola fungovania testu

a. Hodnoty OD

Hodnota OD slepého pokusu by mala byť < 0,15.

Hodnoty OD negatívnych kontrolných roztokov by mali byť nižšie ako hodnoty OD uvedené v certifikáte kontroly kvality, hodnoty OD pozitívnych kontrolných roztokov ako aj kontrolných sér s hodnotou odstrihnutia (cut-off) by mali byť vyššie, ako hodnoty OD uvedené v certifikáte kontroly kvality.

b. Jednotky VIROTECH (VIROTECH Einheiten - VE)

Jednotky VIROTECH (VE) kontrolných roztokov sér s hodnotou odstrihnutia (cut-off) sú definované ako 10 VE. Výpočítané VE pozitívnych kontrol by sa mali nachádzať v rámci rozpätí, uvedených v certifikáte kontroly kvality.

Ak výsledky testu (hodnoty OD, VE) nezodpovedajú požiadavkám, musí sa test zopakovať.

8.2 Výpočet jednotiek VIROTECH (VE)

Extinkcia slepého pokusu (450/620 nm) sa musí odpočítať od všetkých extinkcií.

$$\text{VE (pozit. kontr. roztok)} = \frac{\text{OD (pozitívny kontr. roztok)} - \text{OD (kontr. roztok cut-off)}}{\text{OD (kontr. roztok cut-off)}} \times 10$$

$$\text{VE (pacientovo sérum)} = \frac{\text{OD (pacientovo sérum)} - \text{OD (kontr. roztok cut-off)}}{\text{OD (kontr. roztok cut-off)}} \times 10$$

8.3 Schéma vyhodnotenia IgG a IgM

Výsledok (VE)	Posúdenie
< 9,0	negatívne
9,0 - 11,0	medzná hodnota
> 11,0	pozitívne

- Ak namerané VE vzorky ležia nad medznou oblasťou, tak sa tieto vzorky považujú za pozitívne.
- Ak sa namerané hodnoty VE nachádzajú v rámci uvedeného medzného rozpätia, nezistila sa žiadna signifikantne vysoká koncentrácia protilátok, teda vzorky sa považujú za medzné. Pre spoľahlivý dôkaz infekcie je potrebné stanoviť obsah protilátok dvoch vzoriek séra. Jedna vzorka séra by sa mala otestovať priamo po vypuknutí infekcie, druhá vzorka o 5-10 dní neskôr (rekonvalescentné sérum). Koncentrácia protilátok oboch vzoriek sa musí určiť paralelne, t. j. v rámci jednej prípravy pokusu. Na základe vyhodnotenia jednej jedinej vzorky séra nie je možné urobiť korektnú diagnózu.
- Ak namerané hodnoty ležia pod definovaným medzným rozpätím, nenachádzajú sa vo vzorke žiadne merateľné antigénovo-špecifické protilátky. Vzorky sa považujú za negatívne.
- V prípade, keď výsledok je IgM pozitívny, odporúča sa výsledok preveriť s polymerázovou reťazovou reakciou (PCR).

8.4 Hranice testu

- Interpretácia serologických výsledkov by mala vždy brať zreteľne klinický obraz, epidemiologické dáta a prípadne ďalšie laboratórne nálezy, ktoré sú k dispozícii.
- Napriek všetkým prednostiam eseje gG2 sú aj momenty, ktoré poukazujú na jeho limity: Na jednej strane môže terapia s acyklovírusom ovplyvniť tvorbu protilátok (3) a na druhej strane môže genetická variabilita proteínu gG2 viesť ku gG2 negatívnym kmeňom HSV 2.

9. Literaturá

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, Sahli 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.

Príprava vzoriek pacientov a premývacieho roztoku

É **Premývací roztok:** Koncentrát doplniť na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou

É **Vzorky IgG - Zriedenie**
1:101

napr.:
10 µl séra/plazmy + 1000 µl riediaceho pufru
(Pufer na riedenie séra je pripravený na použitie)

É **Vzorky IgM ň Zriedenie**
1:101

Adsorpcia reumatického faktora pomocou prípravku RF SorboTech

napr.:
5 µl séra/plazmy + 450 µl riediaceho pufru +
1 kvapka prípravku RF-SorboTech inkubovať pri teplote miestnosti 15 min

Vykonanie testu

