



**ENZYWELL**

**HERPES SIMPLEX 1+2 IgM**

**REF 91021 (96 tests)**

Prodotto da/Manufactured by/ Hersteller:  
 Κατασκευάζεται από/ Fabricado por/ Fabriqué par:  
 DIESSE Diagnostica Senese  
 Strada dei Laghi 39  
 53035 Monteriggioni (Siena) - Italy

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Capitolo<br>Section<br>Capítulo |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Modifiche introdotte nella revisione corrente<br>Changes introduced in the current revision<br>Eingeführte Änderungen in der vorliegenden Fassung<br>Τροποποιήσεις που εισήχθησαν στην τρέχουσα διόρθωση<br>Cambios introducidos en la revisión actual<br>Modifications apportées à la révision courante<br>Alterações introduzidas na revisão atual | 4                               |



**INDICE / INDEX / INHALT/ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / INDICE / SOMMAIRE / CONTEÚDO**

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / VERWENDUNGSZWECK/ ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ / INDICACIONES DE USO/ UTILISATION/UTILIZAÇÃO PRETENDIDA
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / PHYSIOLOGIE/ ΕΙΣΑΓΩΓΗ / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / INTERET CLINIQUE / SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / TESTPRINZIP/ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCIPE/ PRINCÍPIOS DO TESTE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / INHALT DES KITS UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN / ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΡΙΩΝ / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS / CONTEÚDA DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE /
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN / ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΡΙΩΝ/ CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS / ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN/ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUTIONS D'UTILISATION / PRECAUÇÕES
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / ART UND LAGERUNG DER PROBEN / ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION / TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / TESTDURCHFÜHRUNG / ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / PROCEDIMIENTO DEL TEST / PROCEDURE / PROCEDIMENTO DE TESTE /
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / TESTSCHEMA / ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ/ ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / SCHEMA D'ANALYSE/ ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE /
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / TESTVALIDIERUNG / ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ / VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDATION DU TEST / VALIDAÇÃO DO TESTE /
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETATION DER ERGEBNISSE / ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETATION DU TEST / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / GRENZEN DES VERFAHRENS / ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITES DU TEST/ LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO /
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ANALYTISCHE SPEZIFITÄT / ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ/ ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / SPECIFICITE ANALYTIQUE / ESPECIFICIDADE ANALÍTICA /
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / DIAGNOSTISCHE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT / ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES / ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO
15. PRECISIONE / PRECISION / PRÄZISION / ΑΚΡΙΒΕΙΑ / PRECISIÓN / PRECISION / PRECISÃO
16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING" / "TROUBLE SHOOTING" (PROBLEMLÖSUNGEN) / ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ / GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUTION DES PROBLEMES / RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / LITERATUR / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHIE / REFERÊNCIAS



## ISTRUZIONI PER L'USO

### **ENZYWELL HERPES SIMPLEX 1+2 IgM**

**REF** 91021

**(Italiano)**

#### **1. UTILIZZAZIONE**

**KIT IMMUNOENZIMATICO A CATTURA PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgM ANTI HERPES SIMPLEX VIRUS 1 + 2 NEL SIERO UMANO. DA UTILIZZARE COME AUSILIO ALLA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA HERPES SIMPLEX VIRUS.**

#### **2. INTRODUZIONE**

Herpes simplex virus (HSV) è un membro della famiglia degli Herpesviridae del quale si conoscono due tipi: il tipo 1 (HSV-1) ed il tipo 2 (HSV-2), che si distinguono per differenze antigeniche minori. HSV-1 è responsabile principalmente di lesioni oro-facciali, mentre HSV-2 di lesioni genitali, ma questa distinzione è solo approssimativa ed entrambi i tipi possono essere responsabili di infezione in ambedue le sedi. Inoltre HSV può essere responsabile di una forma di cheratite oculare e di danni a carico del sistema nervoso centrale.

HSV colpisce virtualmente tutta la popolazione. L'infezione primaria è spesso subclinica e raramente viene diagnosticata. Dopo un periodo di latenza di durata variabile, si possono avere fenomeni di riattivazione con replicazione virale accompagnata o no da lesioni cliniche. Particolare interesse riveste l'infezione contratta alla nascita, in quanto responsabile di una considerevole morbidità e mortalità.

Può essere perciò importante la valutazione dello stato immunitario della donna durante la gravidanza al fine di rilevare una eventuale sierconversione. Il dosaggio delle IgM specifiche è importante per la diagnosi di infezione neonatale e di encefalite da HSV. Inoltre la presenza di IgM specifiche è indice di attività virale in atto, anche se non permette di discriminare tra infezione primaria e riattivazione.

#### **3. PRINCIPIO DEL METODO**

Il test per il dosaggio delle IgM anti HSV si basa sul principio della cattura di queste immunoglobuline e successiva rivelazione di quelle specifiche sfruttando la loro capacità di legare un antigene coniugato a perossidasi.

La cattura si effettua con anticorpi monoclonali legati alla fase solida (pozzetti di microtiter). L'antigene è costituito da un mix dell'Herpes Simplex Virus di tipo 1 e tipo 2, purificato ed inattivato. Il coniugato è composto da monoclonali specifici anti-HSV, marcati con perossidasi.

#### **4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI**

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.

**Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.**

**MT PLATE** MICROPIASTRA. 12x8 pozzetti sensibilizzati con anticorpi monoclonali anti-IgM umane.

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta al codice (M seguito dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto e gli strips necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

**CONTROL +** CONTROLLO POSITIVO 1x1.6 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi anti-HSV IgM, in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0.09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

**CONTROL CUT-OFF** CONTROLLO CUT OFF 1x2.5 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi anti-HSV IgM, in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0.09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

**Ag** ANTIGENE Liofilo x 6 fiale

Contenuto: Herpes Simplex Virus purificato, in tampone fosfato contenente lattosio.

Preparazione: Ricostituire con il volume di coniugato indicato in etichetta agitando per inversione.

**CONJ** CONIUGATO 1 x 18 mL

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti-HSV marcati con perossidasi, in tampone fosfato contenente fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%.

Preparazione: pronto all'uso.

L'immunocomplesso deve essere preparato 45 minuti prima dell'uso.

**CONTROL IgM -** IgM CONTROLLO NEGATIVO (PF93900) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Siero umano in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0.09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

**WASH BUF 10x** TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5%.

Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

**SAMP DIL 2** DILUENTE 2 (PF93611) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con sodio azide 0.09% più colorante (metilarancio).

**SUBS TMB** SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Pronto all'uso.

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL ed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01% stabilizzati in tampone citrato 0.05 mol/L (pH 3.8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

**ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO**

- Incubatore a 37°-40°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm, con linearità fino ad OD >= 2,000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi compresi tra 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µl di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

**5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI**

**I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.**

**La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.**

**I Reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:**

| REAGENTE              | CONDIZIONI                                                            |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| MICROPIASTRA          | 5 settimane 2/8°C busta di polietilene                                |
| CONTROLLI             | 5 settimane 2/8°C                                                     |
| ANTIGENE RICOSTITUITO | va utilizzato in giornata; non può essere congelato                   |
| CONIUGATO             | 5 settimane 2/8°C                                                     |
| SUBSTRATO             | fino alla scadenza a 2/8°C, 1 settimana a 15/30°C; conservare al buio |
| DILUENTE CAMPIONI     | fino alla scadenza a 2/8°C                                            |
| TAMPONE DI LAVAGGIO   | p.uso 2 settimane 2/8°C, 5 gg 15/30 °C                                |
| SOLUZIONE BLOCCANTE   | fino alla scadenza a 2/8°C                                            |

**6. PRECAUZIONI ED AVVERTENZE**

**SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO. CONSERVARE A 2-8°C****Attenzione:**

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HbsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

**Smaltimento dei residui: i campioni di siero e i reagenti usati devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di legge vigenti.**

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
2. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
  - a) Il tampone di lavaggio contiene detergenti
  - b) Il coniugato contiene fenolo
  - c) Il substrato è acido
  - d) I controlli contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi.

Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
3. Le apparecchiature non disposable devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1 h a 121°C; i disposables devono essere autoclavati o inceneriti.
4. L'acido solforico contenuto nello Stop Solution e l'acido cloridrico usato per lavare la vetreria sono corrosivi; tali sostanze devono essere adoperate con cautela. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulita, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**  
Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO<sub>2</sub>.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.

11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
12. L'uso del kit con strumento automatici deve essere validato dall'utilizzatore.
13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
  - installazione e requisiti particolari
  - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
  - specifiche del produttore e performance dello strumento
  - manutenzione e assistenza tecnica

## **7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE**

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato con appropriati accorgimenti come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C per periodi maggiori a -20°C e può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. I sieri scongelati devono essere agitati con cura prima del dosaggio. L'inattivazione al calore può fornire risultati erranei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati. **Il test non è applicabile a plasma umano.**

## **8. PROCEDIMENTO**

### **Tecnica manuale**

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).
- Preparare l'immunocomplesso, ricostituendo il liofilo con il coniugato (volume indicato in etichetta).

Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente. Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato. Distribuire 100 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato). In uno strip porre i controlli (NON DILUITI) (100 µL per pozzetto). Il requisito minimo indispensabile è di 1 controllo negativo, 2 cut-off e 1 positivo. Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 45 min. a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30 secondi ciascuno (300 µl) si aggiungono 100 µL dell'immunocomplesso (antigene/anticorpi monoclonali anti-HSV marcati con POD) per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Si lava di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi si distribuisce il Substrato, 100 µL/pozzetto. Dopo 15 min. a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la Assorbanza (O.D.) a 450 nm o a 450/620 nm entro 30 min.

|                             |
|-----------------------------|
| <b>9. SCHEMA DEL SAGGIO</b> |
|-----------------------------|

### **Tecnica manuale**

- |        |                                                                       |
|--------|-----------------------------------------------------------------------|
| STEP 1 | Pipettare 100 µL di siero diluito/controlli nei pozzetti dello strip. |
|        | -                                                                     |
|        | Incubare 45 min. a 37°C                                               |
|        | -                                                                     |
|        | Lavare 4 volte (300 µl)                                               |
|        | -                                                                     |
| STEP 2 | Pipettare 100 µL di immunocomplesso per pozzetto                      |
|        | -                                                                     |
|        | Incubare 45 min. a 37°C                                               |
|        | -                                                                     |
|        | Lavare 4 volte (300 µl)                                               |
|        | -                                                                     |
| STEP 3 | Pipettare 100 µL di Substrato per pozzetto                            |
|        | -                                                                     |
|        | Incubare 15 min. a t.a.                                               |
|        | -                                                                     |
| STEP 4 | Aggiungere 100 µL di Soluzione bloccante                              |
|        | -                                                                     |
|        | Leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min.                                 |

## **10. VALIDAZIONE DEL TEST**

Togliere il valore del bianco ( $\leq 0.150$ ) a tutte le altre letture. I valori in O.D. del siero di controllo Cut-off devono essere entro il 25% del valore medio se testato in triplicato. Scartare eventualmente il valore aberrante e ricalcolare la media. Il positivo deve avere O.D. pari almeno a 1.5 volte il Cut-off. Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere  $\leq 0.6$ . La D.O. del cut-off deve essere  $\geq 0.2$  a 450 nm e  $\geq 0.16$  a 450/620 nm.

## **11. INTERPRETAZIONE DEL TEST**

### **Risultati qualitativi**

Se il valore dell'assorbanza del campione è superiore al Cut-off il campione risulta positivo per la presenza di IgM specifiche per l'antigene.

Calcolare il rapporto fra il valore della D.O. del campione in esame e quello del Cut-Off (INDEX). Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è  $> 1.2$ .

Dubbio:  $= \pm 20\%$  del Cut-Off.

Negativo: quando il rapporto è  $< 0.8$ .

In caso di risultato dubbio ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio, ripetere il prelievo.

## **12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**

Come nel caso di molti tests sierologici, i risultati servono soltanto come indicazione per la diagnosi e devono essere sempre interpretati insieme ad altri tipi di indagine.

Per determinare la sieroconversione è necessario dosare dei campioni accoppiati. Il primo campione viene prelevato al più presto dopo l'inizio dei sintomi, mentre il secondo dopo 2-3 settimane. Se il primo viene raccolto troppo tardi durante il corso dell'infezione, la sieroconversione potrebbe non essere dimostrabile. Se i risultati dei sieri accoppiati non danno risultato definitivo, bisogna dosare nuovamente i campioni.

I risultati devono essere sempre interpretati insieme ad altri provenienti dalla valutazione clinica e da altre indagini diagnostiche.

## **13. SPECIFICITA' ANALITICA**

Sono stati testati 67 campioni di sieri contenuti potenziali interferenti:

- Anticorpi Antinucleo (ANA) (n=12)
- Fattore Reumatoide (n=8)
- Anticorpi eterofili (n=5)
- Bilirubina (n=9)
- Trigliceridi (n=10)
- Citomegalovirus IgM (n=23)

in nessun caso si sono osservate interferenze

## **14. SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ' DIAGNOSTICA**

In una sperimentazione clinica esterna, 313 campioni erano analizzati con il kit Diesse in confronto con un metodo presente in commercio. Tutti i campioni discordanti erano analizzati in un terzo metodo della concorrenza. I risultati sono riassunti nella tabella seguente:

|        |   | RIFERIMENTO |     |
|--------|---|-------------|-----|
|        |   | +           | -   |
| DIESSE | + | 43          | 6   |
|        | - | 2           | 262 |

Il kit Enzywell ha una sensibilità del 95.6% ed una specificità del 97.8%.

**15. PRECISIONE****Precisione nella prova:**

| Campione      | HSM 1<br>(Negativo<Cut Off) | HSM 2<br>(Positivo>Cut Off) | HSM 3<br>(Positivo) | Cut Off | Controllo<br>Positivo |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|---------|-----------------------|
| n (replicati) | 23                          | 24                          | 24                  | 12      | 12                    |
| D.O.          | 0.202                       | 0.643                       | 0.816               | 0.638   | 1.404                 |
| CV%           | 23%                         | 14%                         | 8%                  | 15%     | 6%                    |

**Precisione tra prove:**

| Campione           | Index |     |
|--------------------|-------|-----|
|                    | Media | CV% |
| Controllo Positivo | 5.8   | 6   |
| HSM1               | 0.4   | 14  |
| HSM2               | 1.2   | 13  |
| HSM3               | 2.0   | 11  |

**Precisione fra lotti:**

| Campione | INDEX        |              |              | Media | CV% |
|----------|--------------|--------------|--------------|-------|-----|
|          | Lotto n. 128 | Lotto n. 129 | Lotto n. 130 |       |     |
| HSM1     | 0.4          | 0.4          | 0.3          | 0.4   | 16  |
| HSM2     | 1.3          | 1.3          | 1.1          | 1.2   | 9   |
| HSM3     | 2.2          | 1.9          | 1.7          | 1.9   | 13  |

**16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO**

| PROBLEMA                         | POSSIBILI FONTI DI ERRORE                                                              | AZIONI DA INTRAPRENDERE                                                                                                        |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Seduta invalida (tutti negativi) | Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato | Controllare nuovamente la procedura.<br>Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto.<br>Ripetere il test.             |
|                                  | Piastra non reattiva                                                                   | Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi istruzioni per l'uso punto 4 per il codice corretto).                    |
|                                  |                                                                                        | Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test. |
| Seduta invalida (tutti positivi) | Inquinamento del substrato                                                             | Prelevare una nuova aliquota del substrato.                                                                                    |
|                                  | Lavaggio inadeguato                                                                    | Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore                                                                                |
| Scarsa precisione                | Lavaggio incompleto dei pozzetti                                                       | Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore                                                                                |
|                                  | Aspirazione inadeguata dei pozzetti                                                    | Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore                                                                                |
|                                  | Errore del pipettamento                                                                | Controllare il funzionamento della pipetta                                                                                     |
|                                  | Aggiunta dei reagenti troppo lenta                                                     | Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente.                                   |
|                                  | Presenza di bolle d'aria                                                               | Evitare la formazione di bolle d'aria durante il pipettamento                                                                  |
|                                  | Percorso ottico non limpido                                                            | Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con fazzoletto di carta.                |
| Insufficiente sviluppo di colore | Tempo o temperatura di incubazione non corretto                                        | Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione                                                        |
|                                  |                                                                                        | Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.                                                                                  |
|                                  | Substrato aggiunto in volume                                                           | Controllare il funzionamento della pipetta.                                                                                    |

|  |            |  |
|--|------------|--|
|  | inadeguato |  |
|--|------------|--|

**17. BIBLIOGRAFIA**

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. S. Land et al.: Rapid diagnosis of herpes simplex virus infections by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 19: 865 (1984).
3. B. Gonik et al.: Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 29: 436 (1991).
4. C. Gleaves et al.: Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of herpes simplex virus (HSV) antigen from clinical specimens in viral transport media. J. Virological Meth. 28: 133 (1990).
5. M. Morgan and T. Smith: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 19: 730 (1984).
6. D. Ho et al.: Indirect ELISA for the detection of HSV-2 specific IgG and IgM antibodies with glycoprotein G (gG-2). J. Virological Meth. 36: 249 (1992).
7. R. Eberle et al.: The immune response to herpes simplex virus: comparison of the specificity and relative titers of serum antibodies directed against viral polypeptides following primary herpes simplex virus type 1 infections. J. Med. Virology 16: 1247 (1985).
8. J.E. Kuhn et al.: Analysis of the IgM and IgG antibody response against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) structural and nonstructural proteins. J. Medical Virology 23: 135 (1987).



## INSTRUCTIONS FOR USE

### **ENZYWELL HERPES SIMPLEX 1+2 IgM**

**REF** 91021

(English)

#### **1. INTENDED USE**

**IMMUNOENZYMATIC CAPTURE METHOD FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgM-CLASS ANTIBODIES TO HERPES SIMPLEX VIRUS (TYPES 1 AND 2) IN HUMAN SERUM, AS AN AID IN THE DIAGNOSIS OF HERPES SIMPLEX VIRUS INFECTION.**

#### **2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST**

The Herpes simplex virus (HSV) is a member of the Herpesviridae family, of which two types are known: type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) which present slight antigenic differences. HSV-1 causes chiefly oral-facial lesions, while HSV-2 is mainly responsible for genital lesions, but this distinction is not binding, both types occasionally causing infection in either anatomical site. HSV may also cause a form of ocular cheratitis, and lesions of the central nervous system.

HSV can affect practically the whole population. The primary infection is often in a subclinical form and is rarely diagnosed. After a latency period of variable duration, reactivation may occur and viral replication may or may not give rise to clinical lesions. Infection contracted during birth is of particular interest, this being an important cause of morbidity and mortality. It is therefore important to determine the immunitary state of women during pregnancy in order to detect serum conversion. The assay of specific IgM is important for the diagnosis of neonatal infection and encephalitis caused by HSV. Moreover, the presence of specific IgM indicates viral activity in progress, although it is not possible to distinguish between primary infection and reactivation.

#### **3. PRINCIPLE OF THE TEST**

The test for the assay of HSV IgM is based on the principle of the capture of these immunoglobulins and the subsequent identification of those which are specific, making use of their ability to bind an antigen conjugated to peroxidase (1-8). The capture is performed using monoclonal antibodies bound to the solid phase (microtiter wells). The antigen is composed of purified, inactivated HSV type 1 and type 2. The conjugate is composed of specific anti-HSV monoclonal antibodies labelled with peroxidase.

#### **4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION**

- Reagents are sufficient for 96 determinations.

**Bring to room temperature before use.**

**MT PLATE** MICROPLATE 12x8 wells coated with anti-human IgM monoclonal antibodies.

Use: open the package at the opposite end from the code (M followed by the lot number) which is useful for identification purposes, remove the support and strips to be used from the foil package, and place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

**CONTROL +** POSITIVE CONTROL 1 x 1.6 mL

Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

Colour: the colour is proportional to the relative antibody titer.

**CONTROL CUT-OFF** CUT OFF CONTROL 1 x 2.5 mL

Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

Colour: the colour is proportional to the relative antibody titer.

**Ag** ANTIGEN Freeze-dried powder x 6 vials

Contents: Purified Herpes Simplex Virus, in Phosphate buffer with lactose.

Preparation: reconstitute with the conjugate volume shown on the label, mixing by inversion.

**CONJ** CONJUGATE 1 x 18 mL

Contents: monoclonal antibodies labelled with peroxidase, in phosphate buffer with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

Preparation: ready for use.

The immunocomplex should be prepared about 45 min. before use.

**CONTROL IgM -** IgM NEGATIVE CONTROL (PF93900) 1 x 1.6 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

**WASH BUF 10x** WASH BUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5%.

Preparation: dilute the required volume 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

**SAMP DIL 2** DILUENT 2 (PF93611) 1 x 100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

To be used to dilute samples.

Contents: Proteic solution in phosphate buffer with sodium azide 0,09% containing methyl orange as dye.

**SUBS TMB** SUBSTRATE (PF93619) 1x 12 mL Ready for use **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and hydrogen peroxide 0.01% stabilised in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

#### **MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

- Incubator at 37°C
- Microplate reader (wavelength 450 or 450/620 nm, with linearity up to OD >= 2000)
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µl
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue.

#### **5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS**

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

#### **Reagents have a limited stability after opening and/or preparation**

| REAGENT               | CONDITIONS                                                           |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Microplate            | 5 weeks at 2/8°C, polythene bag                                      |
| Controls              | 5 weeks at 2/8°C                                                     |
| Conjugate             | 5 weeks at 2/8°C                                                     |
| Reconstituted antigen | must be used the same day; cannot be frozen                          |
| Substrate             | up to the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C; store in the dark |
| Sample Diluent        | up to the expiry date at 2/8°C                                       |
| Wash Buffer           | 2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.                                 |
| Stop Solution         | up to the expiry date at 2/8°C                                       |

## 6. PRECAUTIONS

### FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

#### Caution:

This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by FDA-approved methods for the presence of HbsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling material of human origin.

**Waste disposal:** serum samples and reagents once used must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.

#### Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
  - a) The Wash Buffer contains detergents
  - b) The conjugate contains phenol
  - c) The substrate is acid
  - d) The controls contain 0.09% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides.

If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
3. Non-disposable apparatus should be sterilized after use. The preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C; disposables should be autoclaved or incinerated.
4. Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If they come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
5. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

#### Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature.
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO<sub>2</sub> incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.

12. Use of the kit with automatic instruments must be validated by the user.
13. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:
  - installation and particular requisites
  - operating principles, instructions, precautions and risks
  - manufacturer's specifications and instrument performance
  - servicing and maintenance.

## **7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE**

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at -20°C, and can be thawed a maximum of 3 times. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted samples must be carefully shaken before the test. Heat inactivation can lead to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided. **The test cannot be performed on human plasma.**

## **8. TEST PROCEDURE**

### **Manual Technique**

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).
- Prepare the immunocomplex by reconstituting the freeze-dried powder with the conjugate (volume shown on the label).

Dilute samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent. Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture. Dispense 100 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED controls in a strip (100 µL in each well). The minimum requisite is 1 negative control, 2 cut-off and 1 positive control.

Wells are covered with protective film and incubated for 45 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µl), add 100 µL of the immunocomplex (Antigen/monoclonal antibodies anti-HSV labelled with HRP) to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well.

After 15 minutes at room temperature the enzymatic reaction is stopped with 100 µL of Stop Solution.

The adsorbance (O.D.) is read at 450 nm or at 450/620 nm within 30 min.

|                                    |
|------------------------------------|
| <b>9. SCHEME OF TEST PROCEDURE</b> |
|------------------------------------|

### **Manual Technique**

STEP 1 Place 100 µL of diluted sample//controls to the wells of the strips.

-  
Incubate for 45 min. at 37°C

-  
Wash 4 times (300 µL)

STEP 2 Add 100 µL of immunocomplex to each well

-  
Incubate for 45 min. at 37°C

-  
Wash 4 times (300 µL)

STEP 3 Add 100 µL of Substrate to each well

-  
Incubate for 15 min. at R.T.

STEP 4 Add 100 µL of Stop Solution

-  
Read absorbance at 450 nm within 30 min

**10. TEST VALIDATION**

Subtract the value of the blank ( $\leq 0.150$ ) from all the other readings. The O.D. values of the control Cut-off serum must be within 25% of the mean value if tested in triplicate. Disregard any abnormal value and recalculate the mean. The Positive control must have an O.D. at least 1.5 times that of the Cut-Off serum. The ratio between Negative Control and Cut-off must be  $\leq 0.6$ . The OD cut-off must be  $\geq 0.2$  at 450 nm and  $\geq 0.16$  at 450/620 nm.

**11. INTERPRETATION OF THE RESULTS****Qualitative results**

If the adsorbance of the sample is higher than that of the Cut-Off, the sample is positive for the presence of specific IgM.

Calculate the ratio between the O.D. value of the sample and that of the Cut-off (INDEX). The sample is considered:

Positive: if the ratio is  $> 1.2$ .

Doubtful:  $\pm 20\%$  of the Cut-Off.

Negative: if the ratio is  $< 0.8$ .

If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, collect a new serum sample.

**12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

As with many other serological tests, the results obtained serve only as an aid to diagnosis and should always be interpreted together with other findings.

Paired specimens are required for determining seroconversion. Collect the first specimen as soon as possible after onset of symptoms, and the second specimen 2-3 weeks later. If the first sample is taken too late during the course of infection, seroconversion may not be detected. If the test results obtained for paired samples are inconclusive, reassay the specimens. Results must always be interpreted together with an evaluation of the clinical picture and results of other diagnostic investigations.

**13. ANALYTICAL SPECIFICITY**

67 serum samples containing potential interfering substances were tested:

- Antinuclear antibodies (ANA) (n=12)
- Rheumatoid factor (n=8)
- Heterophile antibodies (n=5)
- Bilirubin (n=9)
- Triglycerides (n=10).
- Cytomegalovirus IgM (n=23)

No interference was noted in any case.

**14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY**

In a clinical trial performed in a hospital laboratory, 313 samples were analysed with the Diesse kit in comparison with another commercial method. All discordant samples were analysed with a third commercial method. The results are reported in the following table.

|        |   | REFERENCE METHOD |     |
|--------|---|------------------|-----|
|        |   | +                | -   |
| DIESSE | + | 43               | 6   |
|        | - | 2                | 262 |

The Enzywell kit has a sensitivity of 95.6% and a specificity of 97.8%.

**15. PRECISION****"In run" Precision**

| Sample         | HSM 1<br>(Negative < Cut Off) | HSM 2<br>(Positive > Cut Off) | HSM 3<br>(Positive) | Cut Off | Positive Control |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|---------|------------------|
| n (replicates) | 23                            | 24                            | 24                  | 12      | 12               |
| O.D.           | 0.202                         | 0.643                         | 0.816               | 0.638   | 1.404            |
| CV%            | 23%                           | 14%                           | 8%                  | 15%     | 6%               |

**“Between run” Precision**

|                 | INDEX |     |
|-----------------|-------|-----|
|                 | Media | CV% |
| <b>Pos.Con.</b> | 5.8   | 6   |
| <b>HSM1</b>     | 0.4   | 14  |
| <b>HSM2</b>     | 1.2   | 13  |
| <b>HSM3</b>     | 2.0   | 11  |

**Precision between lots**

| Sample      | INDEX      |            |            | Average | CV% |
|-------------|------------|------------|------------|---------|-----|
|             | Lot n. 128 | Lot n. 129 | Lot n. 130 |         |     |
| <b>HSM1</b> | 0.4        | 0.4        | 0.3        | 0.4     | 16  |
| <b>HSM2</b> | 1.3        | 1.3        | 1.1        | 1.2     | 9   |
| <b>HSM3</b> | 2.2        | 1.9        | 1.7        | 1.9     | 13  |

**16. TROUBLE SHOOTING GUIDE**

| PROBLEM                      | POSSIBLE SOURCE                                           | TEST OR ACTION                                                                                        |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Invalid run (all negative)   | One or more reagents not added or added in wrong sequence | Recheck procedure<br>Check for unused solutions. Repeat test.                                         |
|                              | Unreactive plate                                          | Check the code on the package containing the plate (see package insert paragraph 4 for correct code). |
|                              |                                                           | Check for moisture in unused plate. (Silica gel dessiccant must be pale yellow). Repeat test          |
| Invalid run (all positive)   | Contamination of substrate                                | Take new aliquot of substrate.                                                                        |
|                              | Inadequate washing                                        | Ensure that wash apparatus works well                                                                 |
| Poor precision               | Incomplete washing of wells                               | Ensure that wash apparatus works well                                                                 |
|                              | Inadequate aspiration of wells                            | Ensure that wash apparatus works well                                                                 |
|                              | Pipetting error                                           | Check pipette function                                                                                |
|                              | Reagent addition too slow                                 | Avoid drying of the plate after washing step.<br>Add reagents immediately                             |
|                              | Presence of bubbles                                       | Avoid air bubbles during pipetting.                                                                   |
|                              | Optical pathway not clean                                 | Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft tissue.           |
| Inadequate Color development | Incorrect incubation times or temperature                 | Check for temperature control and time monitoring                                                     |
|                              |                                                           | Adhere to recommended instruction for use.                                                            |
|                              | Inadequate volume of substrate added to the plate         | Check pipette function.                                                                               |

**17. REFERENCES**

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. S. Land et al.: Rapid diagnosis of herpes simplex virus infections by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 19: 865 (1984).
3. B. Gonik et al.: Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 29: 436 (1991).
4. C. Gleaves et al.: Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of herpes simplex virus (HSV) antigen from clinical specimens in viral transport media. J. Virological Meth. 28: 133 (1990).
5. M. Morgan and T. Smith: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 19: 730 (1984).
6. D. Ho et al.: Indirect ELISA for the detection of HSV-2 specific IgG and IgM antibodies with glycoprotein G (gG-2). J. Virological Meth. 36: 249 (1992).

7. R. Eberle et al.: The immune response to herpes simplex virus: comparison of the specificity and relative titers of serum antibodies directed against viral polypeptides following primary herpes simplex virus type 1 infections. *J. Med. Virology* 16: 1247 (1985).
8. J.E. Kuhn et al.: Analysis of the IgM and IgG antibody response against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) structural and nonstructural proteins. *J. Medical Virology* 23: 135 (1987).



# GEBRAUCHSANLEITUNG

## ENZYWELL HERPES SIMPLEX 1+2 IgM

**REF** 91021

(Deutsch)

### 1. VERWENDUNGSZWECK

**ENZYWELL HERPES SIMPLEX 1+2 IGM IST EIN IMMUNENZYMATISCHER „CAPTURE ASSAY“ ZUR QUALITATIVEN BESTIMMUNG VON IGM-ANTIKÖRPERN GEGEN HERPES-SIMPLEX-VIRUS (TYP 1 UND 2) IN HUMANEM SERUM.**

### 2. PHYSIOLOGIE

Das Herpes-simplex-Virus (HSV) ist ein Virus der Herpesviridae-Familie, von dem zwei Serotypen bekannt sind: Typ 1 (HSV-1) und Typ 2 (HSV-2), die kleine Antigenunterschiede aufweisen. HSV verursacht hauptsächlich facio-orale Läsionen, während HSV-2 für Läsionen im Genitalbereich verantwortlich ist. Diese Unterscheidung ist jedoch nicht zwingend, da beide Typen gelegentlich Infektionen in beiden Körperbereichen auslösen. HSV kann auch eine Form der Keratitis sowie Läsionen des Zentralnervensystems verursachen.

Die ganze Bevölkerung kann praktisch mit HSV infiziert sein. Die Primärinfektion tritt häufig in einer subklinischen Form auf und wird selten diagnostiziert. Nach einer Latenzzeit unterschiedlicher Dauer kann es zu einer Reaktivierung kommen, und die Virusreplikation kann u. U. klinische Läsionen hervorrufen. Bei der Geburt zugezogene Infektionen sind von besonderem Interesse, da dies eine wichtige Ursache von Morbidität und Mortalität ist. Daher ist es von großer Wichtigkeit, den Immunstatus von Frauen während einer Schwangerschaft zu ermitteln, um die Serokonversion festzustellen. Die Erfassung spezifischer IgM-Antikörper ist wichtig, um eine durch HSV verursachte Infektion und Enzephalitis bei Neugeborenen zu diagnostizieren. Darüber hinaus deutet das Vorhandensein spezifischer IgM-Antikörper auf eine Virusaktivität hin; dabei ist es jedoch nicht möglich, zwischen einer Primärinfektion und einer Reaktivierung zu unterscheiden.

### 3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der „Capture-Methode“ mit Hilfe von monoklonalen Anti-human-IgM-Antikörpern. In der darauf folgenden Inkubation mit HSV-Antigen in einem Komplex mit monoklonalen Antikörpern, die an Meerrettichperoxidase gebunden sind, werden die antigenspezifischen IgM-Antikörper erfasst und durch die Zugabe von Peroxidase-Substrat angezeigt (1-8). Die Erfassung erfolgt mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die an die Festphase gebunden sind. Das Antigen besteht aus gereinigtem, inaktiviertem HSV Typ 1 und Typ 2. Das Konjugat setzt sich aus spezifischen monoklonalen Anti-HSV-Antikörpern zusammen, die mit Peroxidase gekoppelt sind.

### 4. KITKOMPONENTEN

Die Reagenzien sind ausreichend für 96 Bestimmungen.

**Vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.**

**MT PLATE** MIKROTITERPLATTE 12x8 Wells, beschichtet mit monoklonalen Anti-human-IgM-Antikörpern.

Gebrauch: Die Verpackung an der gegenüberliegenden Seite des Codes (M plus Lotnummer) öffnen und die nicht benötigten Streifen im beigelegten Plastikbeutel mit dem Silica-Gel lagern; die Luft herausdrücken und gut verschließen.

**CONJ** KONJUGAT 1x18 mL

Inhalt: Monoklonale Antikörper, gekoppelt mit Peroxidase, in Phosphatpuffer mit 0.05% Phenol und 0.02.% Bronidox. Gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

**CONTROL +** POSITIVKONTROLLSERUM 1 x 1.6 mL

Inhalt: Verdünntes Humanserum in 0.01 mol/l Phosphatpuffer, 1% BSA und 0.09% Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

Farbe: Die Farbintensität ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

**CONTROL CUT-OFF** CUT-OFF KONTROLLSERUM 1 x 2.5 mL

**Inhalt:** Verdünntes Humanserum in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 1% BSA und 0.09% Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

**Farbe:** Die Farbintensität ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

**Ag ANTIGEN** Lyophilisiert; 6 Fläschchen.

**Inhalt:** Gereinigtes Herpes-simplex-Virus, in Phosphatpuffer, mit Laktose.

**Rekonstitution:** Mit Konjugat rekonstituieren. Das Rekonstitutionsvolumen ist auf den Fläschchenetiketten angegeben.

**CONTROL IgM** - IgM NEGATIVKONTROLLE (PF93910) 1 x 1.6 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

**Inhalt:** Humanserum in 0.01 mol/l Phosphatpuffer, 1% BSA und 0.09% Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

**Stabilität:** Das Produkt ist bis zum Verfallsdatum stabil, wenn es ungeöffnet bei 2-8 °C gelagert wird.

**SUBS TMB** SUBSTRAT (PF93619) 1x12 mL Gebrauchsfertig **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

**Inhalt:** 0.26 mg/ml Tetramethylbenzidin und 0.01 % Wasserstoffperoxid, stabilisiert in 0.05 mol/l Zitratpuffer (pH 3.8).

**SAMP DIL 2** VERDÜNNUNGSMITTEL 2 (PF93611) 1x100 mL Für die Verdünnung von Proben. **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

**Inhalt:** Proteinlösung in Phosphatpuffer mit 0,09 % Natriumazid und Methylorange.

**WASH BUF 10x** WASCHPUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

**Inhalt:** Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 10fach konzentriert; enthält 0.5 % Brij.

**Rekonstitution:** Verdünnen Sie die benötigte Menge 1:10 mit destilliertem Wasser, um den gebrauchsfertigen Waschpuffer herzustellen. Falls Kristalle vorhanden sind, sollten sie vor der Verdünnung bei 37 °C gelöst werden.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** STOPPLÖSUNG (PF93602) 1x16 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

**Inhalt:** H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 mol/l, in gebrauchsfertiger Lösung.

ABDECKFILM (2).

POLYEHTYLENBEUTEL (1).

#### ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

- Inkubator bei 37°C
- Mikrotiterplatten-Reader, Wellenlänge 450 oder bei 450/620 nm, mit einer OD-Linearität bis >= 2000
- Washer für Mikrotiterplatten (empfehlenswert) für ein Dispenservolumen zwischen 225-375 µl
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Normale Laborgläser: Zylinder, Teströhrchen etc.
- Mikropipetten für die exakte Pipettierung von 10, 100, 1000 µl
- Einweg-Handschuhe
- Timer
- Natriumhypochlorit-Lösung (5 %)
- Behälter zum Sammeln von potentiell infektiösem Material
- Saugfähiges Papier

#### 5. LAGERUNG UND STABILITÄT NACH DEM ERSTEN ÖFFNEN

Die Reagenzien müssen bei 2-8 °C gelagert werden.

Das Verfallsdatum ist auf allen Kitkomponenten und dem Packungsetikett angegeben.

**Die Reagenzien haben nach dem ersten Öffnen und/oder der Vorbereitung eine begrenzte Stabilität.**

| REAGENZ           | KONDITIONEN                                                       |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|
| MIKROTITERPLATTE  | 5 Wochen bei 2-8 °C im Polyethylenbeutel                          |
| KONTROLLSERUM     | 5 Wochen bei 2-8 °C                                               |
| KONJUGAT          | 5 Wochen bei 2-8 °C                                               |
| IMMUNKOMPLEX      | 15 Tage bei 2-8 °C                                                |
| SUBSTRAT          | bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C, 1 Woche bei 15-30 °C im Dunkeln |
| VERDÜNNUNGSMITTEL | bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C                                  |
| WASCHPUFFER       | 2 Wochen bei 2-8 °C, 5 Tage bei 15-30 °C                          |
| STOPPLÖSUNG       | bis zum Verfallsdatum bei 2-8 °C                                  |

## 6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN SICHERHEITSHINWEISE

### NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

#### Achtung:

Dieser Kit enthält Bestandteile humanen Ursprungs, die mit einer FDA-geprüften Methode für HbsAg, Anti-HIV-1, Anti-HIV-2 und Anti-HCV-Antikörper negativ waren. Da keine Testmethode mit völliger Sicherheit ausschließen kann, dass Produkte humanen Ursprungs infektiöse Erreger enthalten, sollten alle Materialien humanen Ursprungs als potentiell infektiös betrachtet werden. Alle Materialien sollten gemäß GLP („Gute Laborpraxis“) behandelt werden.

**Entsorgung der Abfälle: Die Serum-Proben und die verwendeten Reagenzien müssen als infizierte Abfälle behandelt werden, das heißt, im Einklang mit den geltenden Vorschriften entsorgt werden.**

#### Gesundheits- und Sicherheitsinformationen

- Nicht mit dem Mund pipettieren. Tragen Sie Einweg-Handschuhe und einen Augenschutz während des Umgangs mit Proben und der Testdurchführung. Waschen Sie sich danach gründlich die Hände.
- Die folgenden Reagenzien enthalten geringe Konzentrationen von schädlichen oder reizenden Substanzen:
  - e) Der Waschpuffer enthält Detergenzien.
  - f) Das Konjugat enthält Phenol.
  - g) Das Substrat ist eine Säure.
  - h) Die Kontrollen enthalten 0,09 % Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei und Kupfer explosive Metallazide bilden.

Falls irgendeines der Reagenzien in Kontakt mit den Augen oder der Haut kommt, waschen Sie den Bereich intensiv mit Wasser.
- Mehrfach verwendbare Materialien oder Gegenstände sollten nach Gebrauch sterilisiert werden. Die bevorzugte Methode ist das Autoklavieren für eine Stunde bei 121 °C, Einwegmaterialien sollten autoklaviert oder verbrannt werden.
- Schwefelsäure (Stop Solution) und Salzsäure (wird für das Waschen der Laborgläser benötigt) sind ätzend und sollten mit entsprechender Sorgfalt behandelt werden. Bei Kontakt mit Augen oder Haut gründlich mit Wasser abwaschen.
- Neutralisierte Säuren oder anderer Flüssigabfall sollten mit einer ausreichenden Menge von Natriumhypochlorit mit einer Endkonzentration von mindestens 1,0 % dekontaminiert werden. Eine 30-minütige Behandlung mit Natriumhypochlorit (1%) ist erforderlich, um eine effektive Dekontamination sicherzustellen.
- Verschüttete potentiell infektiöse Materialien sollten sofort mit saugfähigem Papier aufgewischt werden, und der kontaminierte Bereich sollte mit Natriumhypochlorit (1 %) nachgewischt werden, bevor die Arbeit fortgesetzt wird. Natriumhypochlorit sollte nicht bei verschütteter Flüssigkeit, die Säure enthält, verwendet werden, bevor die Flüssigkeit trocken aufgewischt wurde. Materialien, die für das Aufwischen verschütteter Flüssigkeiten verwendet wurden, inklusive der Handschuhe, sollten wie potentiell biogefährdender Abfall entsorgt werden. Autoklavieren Sie keine Materialien, die Natriumhypochlorit enthalten.

### TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- Bringen Sie alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-30 °C). Bringen Sie die Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder auf die empfohlene Lagerungstemperatur. **Es ist wichtig, bei der korrekten Temperatur zu arbeiten. Überprüfen Sie, dass der Thermostat nicht unterhalb 35 ° und nicht über 39 °C anzeigt.** Öffnen Sie die Packung mit den Streifen erst nach 30 Minuten bei Raumtemperatur.
- Verwenden Sie die Reagenzien nicht über das angegebene Verfalldatum hinaus. Mikrobiologische Kontamination der Reagenzien muss vermieden werden, da dies die Haltbarkeit des Produktes reduzieren und zu falschen Ergebnissen führen kann.
- Die Testdurchführung darf nicht verändert, die Reagenzien dürfen nicht durch Reagenzien von anderen Herstellern oder aus anderen Lots ersetzt werden, es sei denn, dass die Austauschbarkeit von Lots extra angegeben ist. Reduzieren Sie keine der Inkubationszeiten.
- Die für die Reagenzien verwendeten Laborgläser sollten gründlich mit 2M Salzsäure gewaschen und dann mit destilliertem oder deionisiertem Wasser von guter Qualität gespült werden.
- Vermeiden Sie Gefrierschränke mit Abtauautomatik für die Lagerung von Proben.
- Setzen Sie die Reagenzien keiner starken Lichteinstrahlung oder Hypochlorit-Dämpfen während der Lagerung oder der Inkubationsschritte aus.
- Lassen Sie die Wells während der Testdurchführung nicht trocken werden.
- Vermeiden Sie Verschleppungen beim Pipettieren. Es ist wichtig, dass die Pipetten nur für den alleinigen Gebrauch der verschiedenen Reagenzien eingesetzt werden.

- Das Berühren oder Bespritzen des Randes der Wells mit Konjugat sollte sorgfältig vermieden werden. Verschütten Sie keine Flüssigkeit aus den Wells.
- Enzymimmunoassays können gelegentlich einen “Edge-Effect” zeigen, der durch eine Steigerung der Luftfeuchtigkeit während der Inkubationsschritte minimiert werden muss. Die Platten müssen mit Film abgedeckt und bei 37 °C entweder im Wasserbad (mit einem Rack oder einem Schwimmer, um die Platten zu halten, sofern nötig) oder in einem Inkubator inkubiert werden. Alternativ können die Platten in einem überprüften Analysengerät inkubiert werden. Weitere Details entnehmen Sie bitte der entsprechenden Gebrauchsanweisung des Gerätes. Verwenden Sie keine CO<sub>2</sub> Inkubatoren.
- Stellen Sie sicher, dass der Boden der Platte sauber und trocken ist, und dass vor dem Lesen der Platte keine Blasen auf der Oberfläche der Flüssigkeit vorhanden sind.
- Die Verwendung von stark hämolysierten Proben, unvollständig geronnenen Seren, Plasmaproben, die Fibrin enthalten oder mikrobiell kontaminierten Proben führt zu falschen Ergebnissen.
- Die Benutzung der Methode mit automatischen Instrumenten muss von dem Anwender bestätigt werden
- Lesen Sie vor der Verwendung eines Gerätes sorgfältig die Gebrauchsanweisung des Herstellers, damit Sie zu folgenden Punkten Zusatzinformationen erhalten:
  - Installation und besondere Bedarfsartikel
  - Arbeitsprinzip, Hinweise zur Testdurchführung, Vorsichtsmaßnahmen und Risiken
  - Vorgegebene Spezifikationen des Herstellers und Arbeitsweise des Gerätes
  - Service und Wartung

## 7. PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

- Als Probenmaterial wird Serum eingesetzt, das auf die übliche Art aus der Vene unter Berücksichtigung der „Guten Laborpraxis“ entnommen wird. Das frische Serum kann 4 Tage bei 2-8 °C oder für einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert werden. Die Proben dürfen maximal 3-mal aufgetaut werden. Den Gebrauch von Tiefkühlschränken mit automatischem Abtausystem für die Aufbewahrung der Proben vermeiden. Aufgetaute Proben müssen vor Gebrauch sorgfältig geschüttelt werden. Eine Hitzeinaktivierung kann zu falschen Ergebnissen führen. Die Qualität einer Probe kann durch mikrobielle Kontamination ernsthaft beeinflusst werden. Sie führt zu falschen Ergebnissen.
- Stark lipämische, ikterische oder kontaminierte Proben sollten nicht in diesen Assay eingesetzt werden.
- **Es dürfen keine Humanplasmaproben in diesen Assay eingesetzt werden!**

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Bereiten Sie die benötigte Anzahl von Teststreifen vor.

- Bereiten Sie den Waschpuffer vor: Verdünnen Sie den Washing Buffer 1:10 mit destilliertem Wasser (Beispiel 100 ml + 900 ml H<sub>2</sub>O).
- Bereiten Sie den Immunkomplex vor, indem Sie das lyophilisierte Antigen mit Konjugat rekonstituieren. Das erforderliche Konjugatvolumen ist auf dem Antigen-Fläschchenetikett angegeben.

### PIPETTIER- UND INKUBATIONSSCHRITTE

Verdünnen Sie die Proben 1:101, indem Sie 10 µl der Probe 1,0 ml verdünntes Diluent zufügen. Lassen Sie die erste Well für den Substratleerwert frei (100 µl Substrat pipettieren). Pipettieren Sie 100 µl der verdünnten Probe in die entsprechenden Wells (Doppelbestimmungen werden empfohlen). 100 µl unverdünnte Positiv-, Negativkontrolle (Doppelbestimmung) und unverdünntes Cut-Off-Serum (Dreifachbestimmung) in je eine Well pipettieren. (Das Minimum sind 1 Negativkontrolle, 2 Cut-Off und 1 Positivkontrolle.)

Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37 °C inkubieren. 4-mal waschen (300 µl, mit jeweils 30 Sekunden Einwirkzeit). 100 µl Immunkomplex in alle Wells pipettieren (außer Substratleerwert). Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37 °C inkubieren. 4-mal wie oben beschrieben waschen. 100 µl Substrat in alle Wells pipettieren (auch Substratleerwert).

15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen. 100 µl Stop Solution in alle Wells pipettieren (auch Substratleerwert).

Die Extinktion (OD) innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm oder 450/620 nm messen.

## 9. TESTSCHEMA

- 100 µl der verdünnten Probe und unverdünnten Kontrollen in die entsprechenden Wells pipettieren.
- 45 Min. bei 37 °C inkubieren.
- 4-mal waschen (300 ± 75 µl).
- 100 µl Konjugat in alle Wells pipettieren.
- 45 Min. bei 37 °C inkubieren.
- 4-mal waschen (300 ± 75 µl).
- 100 µl Substrat in alle Wells pipettieren.

- H. 15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.  
 I. 100 µl Stopplösung hinzufügen.  
 J. Messen Sie die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 Min. Bei Readern mit 2 Wellenlängen stellen Sie den Referenzfilter auf 600-650 nm ein.

#### 10. VALIDITÄT DES TESTS

Subtrahieren Sie den Substratleerwert ( $\leq 0.15$ ) von allen Extinktionen. Die Extinktion der Einzelwerte des Cut-Off-Serums muss bei einer Dreifachbestimmung innerhalb von 25 % des Extinktionsmittelwertes liegen. Abweichende Werte werden ggf. eliminiert, und der Mittelwert wird anschließend neu berechnet. Die Extinktion der Positivkontrolle muss mindestens das 1.5fache der Extinktion des Cut-Off-Serums betragen, die Extinktion der Negativkontrolle muss  $\leq 0.6$ fache des Cut-Off-Serums betragen. Die OD des Cut-Off muss  $\geq 0.2$  bei 450 nm und  $\geq 0.16$  bei 450/620 nm sein.

#### 11. QUALITATIVE ERGEBNISSE

Wenn die Extinktion der Probe höher als die des Cut-Off ist, enthält die Probe spezifische IgM-Antikörper. Berechnen Sie die Ratio zwischen dem Extinktionswert der Probe und dem des Cut-Off (INDEX). Die Probe ist:  
 positiv: wenn die Ratio  $> 1.2$  ist,

zweifelhaft:  $\pm 20$  % des Cut-Off,

negativ: wenn die Ratio  $< 0.8$  ist.

Falls das Ergebnis zweifelhaft ist, wiederholen Sie den Test. Wiederholen Sie den Test mit einer neuen Probe, falls das Ergebnis zweifelhaft bleibt.

#### 12. GRENZEN DES VERFAHRENS

Wie bei vielen anderen serologischen Tests sollten die Ergebnisse immer nur in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Informationen verwendet werden.

Zur Bestimmung der Serokonversion werden Probenpaare benötigt. Die erste Probe muss so schnell wie möglich nach dem ersten Auftreten von Symptomen, die zweite Probe 2-3 Wochen später gewonnen werden. Es kann keine Serokonversion festgestellt werden, wenn die erste Probe zu spät im Infektionsverlauf genommen wird. Wenn die Testergebnisse für die Probenpaare nicht eindeutig sind, testen Sie die Proben erneut. Die Arbeitsanleitung ist genau zu beachten; eine sorgfältige Arbeitstechnik ist für korrekte Ergebnisse erforderlich. Eine Änderung der Testdurchführung kann zu falschen Ergebnissen führen.

#### 13. ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

67 Serumproben, die potentiell interferierende Substanzen enthielten, wurden gemessen:

- Antinukleäre Antikörper (ANA) (n=12)
- Rheumafaktor (n=8)
- Heterophile Antikörper (n=5)
- Bilirubin (n=9)
- Triglyceride (n=10)
- Cytomegalovirus IgM (n=23)

In keinem Fall wurde dieser Test durch das Vorhandensein dieser Antikörper beeinflusst.

#### 14. RELATIVE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

In einer Studie in einem Krankenhauslabor wurden 313 Proben mit dem -Kit getestet und mit einer anderen kommerziellen Methode verglichen. Alle diskordanten Proben wurden mit einer dritten kommerziellen Methode getestet. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse:

|        |   | REFERENZMETHODE |     |
|--------|---|-----------------|-----|
|        |   | +               | -   |
| Diesse | + | 43              | 6   |
|        | - | 2               | 262 |

Der Enzywell Kit bietet 95,6 % Sensitivität und 97,8 % Spezifität.

#### 15. PRÄZISION

##### Präzision in der Serie

| Probe | HSM 1<br>(Negativ<Cut | HSM 2<br>(Positiv>Cut | HSM 3<br>(Positiv) | Cut Off | Positiv-kontrolle |
|-------|-----------------------|-----------------------|--------------------|---------|-------------------|
|-------|-----------------------|-----------------------|--------------------|---------|-------------------|

|             | Off)  | Off)  |       |       |       |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>n</b>    | 23    | 24    | 24    | 12    | 12    |
| <b>O.D.</b> | 0.202 | 0.643 | 0.816 | 0.638 | 1.404 |
| <b>CV%</b>  | 23%   | 14%   | 8%    | 15%   | 6%    |

**Interassay-Präzision**

|                 | INDEX  |     |
|-----------------|--------|-----|
|                 | Mittel | CV% |
| <b>Pos.kon.</b> | 5.8    | 6   |
| <b>HSM1</b>     | 0.4    | 14  |
| <b>HSM2</b>     | 1.2    | 13  |
| <b>HSM3</b>     | 2.0    | 11  |

**Lot-zu-Lot-Präzision**

| <i>Probe</i> | INDEX      |            |            | <i>Mittel</i> | <i>CV%</i> |
|--------------|------------|------------|------------|---------------|------------|
|              | Lot n. 128 | Lot n. 129 | Lot n. 130 |               |            |
| <b>HSM1</b>  | 0.4        | 0.4        | 0.3        | 0.4           | 16         |
| <b>HSM2</b>  | 1.3        | 1.3        | 1.1        | 1.2           | 9          |
| <b>HSM3</b>  | 2.2        | 1.9        | 1.7        | 1.9           | 13         |

**16. “TROUBLESHOOTING” (PROBLEMLÖSUNGEN)**

Wenn Sie sowohl die Angaben in der Gebrauchsanweisung für die Testdurchführung und deren Spezifikationen beachten als auch sorgfältig mit den Reagenzien umgehen und pipettieren, können Sie die folgenden Fehler vermeiden.

| PROBLEM                               | MÖGLICHE URSACHE                                                                     | MÖGLICHE PROBLEMLÖSUNG                                                                                                            |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ungültiger Testrun<br>(alle negativ)  | Eins oder mehrere Reagenzien wurden nicht zugefügt oder in der falschen Reihenfolge. | Überprüfen Sie die Testdurchführung.<br>Suchen Sie nach evt. ungenutzten Reagenzien.<br>Wiederholen Sie den Test.                 |
|                                       | Nichtreaktive Platte                                                                 | Prüfen Sie den Code auf der Plattenpackung. (Der korrekte Code ist in der Gebrauchsanweisung unter Punkt 4 angegeben.)            |
|                                       |                                                                                      | Prüfen Sie, ob die ungenutzte Platte feucht ist. (Das Silica-Gel Trockenmittel muss blassgelb sein.)<br>Wiederholen Sie den Test. |
| Ungültiger Testrun<br>(alle positiv)  | Kontamination des Substrates                                                         | Nehmen Sie ein neues Substrat.                                                                                                    |
|                                       | Unvorschriftsmäßiges Waschen                                                         | Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.                                                                             |
| Schlechte Präzision                   | Unvollständiges Waschen der Wells                                                    | Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.                                                                             |
|                                       | Unvorschriftsmäßiges Absaugen der Wells                                              | Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.                                                                             |
|                                       | Pipettierfehler                                                                      | Prüfen Sie die Pipettierfunktion.                                                                                                 |
|                                       | Reagenzienzugabe zu langsam                                                          | Vermeiden Sie ein Austrocknen der Platte nach dem Waschschrift. Geben Sie sofort danach die Reagenzien zu.                        |
|                                       | Vorhandensein von Luftblasen                                                         | Vermeiden Sie Luftblasen während des Pipettierens.                                                                                |
|                                       | Optischer Weg nicht sauber                                                           | Überprüfen Sie die Lichtquelle und den Detektor auf Verschmutzung. Reinigen Sie den Boden der Platte mit einem weichen Tuch.      |
| Nicht ausreichende<br>Farbentwicklung | Unvorschriftsmäßige Inkubationszeit oder -temperatur                                 | Prüfen Sie die Temperaturkontrolle und die Zeitüberwachung.                                                                       |
|                                       |                                                                                      | Beachten Sie die Vorschriften in der Gebrauchsanweisung.                                                                          |
|                                       | Unvorschriftsmäßiges Pipettiervolumen von Substrat                                   | Prüfen Sie die Pipettierfunktion.                                                                                                 |

**17. LITERATUR**

9. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
10. S. Land et al.: Rapid diagnosis of herpes simplex virus infections by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 19: 865 (1984).
11. B. Gonik et al.: Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 29: 436 (1991).
12. C. Gleaves et al.: Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of herpes simplex virus (HSV) antigen from clinical specimens in viral transport media. J. Virological Meth. 28: 133 (1990).
13. M. Morgan and T. Smith: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 19: 730 (1984).
14. D. Ho et al.: Indirect ELISA for the detection of HSV-2 specific IgG and IgM antibodies with glycoprotein G (gG-2). J. Virological Meth. 36: 249 (1992).
15. R. Eberle et al.: The immune response to herpes simplex virus: comparison of the specificity and relative titers of serum antibodies directed against viral polypeptides following primary herpes simplex virus type 1 infections. J. Med. Virology 16: 1247 (1985).
16. J.E. Kuhn et al.: Analysis of the IgM and IgG antibody response against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) structural and nonstructural proteins. J. Medical Virology 23: 135 (1987).



ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

**ENZYWELL  
IgM ΑΠΛΟΥ ΕΡΠΗΤΑ 1+2**

**REF 91021**

(Ελληνικά)

**1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ**

**ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΛΛΗΨΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ IgM ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΑΠΛΟΥ ΕΡΠΗΤΑ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ 1 ΚΑΙ 2 ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ.**

**2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Ο ιός του απλού έρπητα (HSV) ανήκει στην οικογένεια των Ερπητοϊών της οποίας είναι γνωστοί δύο τύποι: ο τύπος 1 (HSV-1) και ο τύπος 2 (HSV-2), που παρουσιάζουν ελάχιστονες αντιγονικές διαφορές. Ο HSV-1 προκαλεί κυρίως έλκη στόματος-προσώπου ενώ ο HSV-2 έλκη γεννητικών οργάνων, αλλά αυτή η διάκριση είναι απλά ενδεικτική γιατί και οι δύο τύποι μπορεί να γίνουν αίτιοι λοίμωξης και στις δύο περιοχές. Επιπλέον ο HSV μπορεί να προκαλέσει μία μορφή οφθαλμικής κερατίτιδας και βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Ο HSV θεωρητικά μπορεί να προσβάλλει όλο τον πληθυσμό. Η πρωτογενής λοίμωξη παρουσιάζει συχνά υπο-κλινικές εκδηλώσεις των οποίων σπάνια γίνεται διάγνωση. Μετά από μία λανθάνουσα περίοδο, με όχι σταθερή διάρκεια, μπορεί να παρουσιαστούν φαινόμενα επανενεργοποίησης με πολλαπλασιασμό του ιού που μπορεί να συνοδεύεται και από κλινικές εκδηλώσεις. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον δίνεται στην εκ γενετής λοίμωξη, γιατί είναι αίτιος υψηλού βαθμού νοσηρότητας και θνησιμότητας.

Γι' αυτό τον λόγο έχει μεγάλη σημασία να είναι γνωστή η ανοσολογική κατάσταση της γυναίκας κατά την εγκυμοσύνη, με σκοπό να ανιχνευθεί μια ενδεχόμενη ορομετατροπή. Ο προσδιορισμός των ειδικών IgM είναι σημαντικός στη διάγνωση των νεογνικών λοιμώξεων και στην εγκεφαλίτιδα από HSV. Επιπλέον, η παρουσία των ειδικών IgM είναι ένδειξη ικής δραστηριότητας σε εξέλιξη, παρ' όλο που δεν επιτρέπει την διάκριση μεταξύ πρωτογενούς λοίμωξης και επανενεργοποίησης.

**3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Το τεστ προσδιορισμού των IgM κατά του HSV βασίζεται στην αρχή της σύλληψης και της συλλογής αυτών των ανοσοσφαιρινών και στην μετέπειτα ανίχνευση των ειδικών, εκμεταλλευόμενοι την ικανότητά τους να συνδέονται με το αντιγόνο συζευγμένο με υπεροξειδάση.

Η σύλληψη και συλλογή γίνεται με μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα με τη στερεά φάση (κυψελίδες με μικροπλακίδια στη συσκευή). Το αντιγόνο αποτελείται από ένα συμμιγές από ιούς του Έρπητα του τύπου 1 και 2 κεκαθαρωμένους και αδρανικοποιημένους. Το συζυγές αποτελείται από ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα αντι-HSV, σεσημασμένα με υπεροξειδάση.

**4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ**

- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 96 τεστ

**Φέρτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από τη χρήση.**

**MT PLATE** ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ 12x8 κυψελίδες ευαισθητοποιημένες με ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-IgM.

**Χρήση:** Ανοίξτε το περίβλημα των ταινιών από την αντίθετη πλευρά που αναγράφεται ο κωδικός (Μ ακολουθούμενο από τον αριθμό της παρτίδας) που χρησιμεύει για την ταυτοποίησή της, πάρτε τη βάση και τις απαραίτητες ταινίες. Βάλτε και πάλι πίσω στη σακούλα από πολυαιθυλένιο, που περιέχει γέλη πυριτίας τις ταινίες που δεν χρησιμοποιήσατε, αφαιρέστε τον αέρα και σφραγίστε την πιέζοντας το ειδικό σύστημα κλεισίματος.

**CONTROL +** ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΘΕΤΙΚΟΣ 1x1.6 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός με γνωστή συγκέντρωση αντισωμάτων IgM κατά του HSV, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο του νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αντισωμάτων.

#### **CONTROL CUT-OFF** ΕΛΕΓΧΟΣ CUT-OFF 1x2.5 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός με γνωστή συγκέντρωση αντισωμάτων IgM κατά του HSV, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο του νατρίου 0.09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αντισωμάτων.

#### **Ag** ANTIGONO Κρυο-αφυδατωμένο x 6 αμπούλες

Περιεχόμενο: Ιός Απλού Έρπητα κεκαθαρμένος, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει γαλακτόζη.

Προετοιμασία: Κάνετε την ανασύσταση προσθέτοντας τον όγκο του συζυγούς που αναγράφεται στην ετικέτα και στη συνέχεια ανακατέψτε αναποδογυρίζοντας το διάλυμα.

#### **CONJ** ΣΥΖΥΓΕΣ 1 x 18 mL

Περιεχόμενο: διάλυμα μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά του HSV σεσημασμένων με υπεροξειδάση, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη 0.05% και Bronidox 0.02%.

Προετοιμασία: έτοιμο για χρήση.

Το ανοσοσύμπλοκο πρέπει να έχει προετοιμαστεί 45 λεπτά πριν από τη χρήση.

#### **CONTROL IgM -** ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ IgM (PF93900) 1 x 1.6 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ**

##### **ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο νατρίου 0.09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

#### **WASH BUF 10x** ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ 10X (PF93603) 1 x 100 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ**

##### **ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Περιεχόμενο: Ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα (PBS) συμπυκνωμένο 10 φορές, που περιέχει Brij 0.5%.

Προετοιμασία: Αραιώστε τον απαιτούμενο όγκο σε αναλογία 1:10 με αποσταγμένο νερό για να παρασκευάσετε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης έτοιμο για χρήση. Αν σχηματιστούν κρύσταλλοι, διαλύστε τους στους 37°C πριν την αραιώση.

#### **SAMP DIL 2** ΔΙΑΛΥΤΗΣ 2 (PF93611) 1 x 100 mL **ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων.

Περιεχόμενο: Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) με πρωτεΐνες, αζίδιο του νατρίου και χρωστική ουσία (πορτοκαλί του μεθυλίου).

#### **SUBS TMB** ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (PF93619) 1x12 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Έτοιμο για χρήση.

Περιεχόμενο: Τετραμεθυλβενζιδίνη 0.26 mg/mL και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01% σταθεροποιημένα σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.05 mol/L (pH 3,8).

#### **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (PF93602) 1 x 16 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 mol/L έτοιμο για χρήση.

ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΤΑΙΝΙΑ (2).

ΣΑΚΟΥΛΑ ΑΠΟ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟ (1).

#### **ΑΛΛΟ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ ΑΛΛΑ ΜΗ ΣΥΝΟΔΕΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.**

- Επωαστήριο σε 37°C
- Αναγνώστης μικροπλακιδίων (μήκος κύματος 450 ή 450/620 nm και 405 nm, με γραμμικότητα μέχρι Ο.Π.  $\geq 2,000$ )
- Συσκευή έκπλυσης μικροπλακιδίων (μη απαραίτητη) ικανότητας 225-375  $\mu$ l
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
- Γάντια μίας χρήσης
- Χρονόμετρο
- Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5%
- Δοχεία για την απόρριψη των δυνητικά μολυσματικών υλικών.
- Απορροφητικό χαρτί
- Στάνταρντ υάλινος εξοπλισμός εργαστηρίου: κύλινδροι, δοκιμαστικοί σωλήνες, κ.λ.π.

- Μικροπιπέτες που αναρροφούν με ακρίβεια όγκους 10, 100, 1000  $\mu$ L διαλύματος

## **5. ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ**

**Τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται στους 2/8°C.**

**Η ημερομηνία λήξης είναι τυπωμένη σε κάθε σετ και στην εξωτερική ετικέτα της συσκευασίας.**

**Τα Αντιδραστήρια έχουν περιορισμένη διάρκεια σταθερότητας μετά το άνοιγμα και/ή την προετοιμασία:**

### **ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ**

### **ΣΥΝΘΗΚΕΣ**

ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ

5 εβδομάδες στους 2/8°C μέσα στην σακούλα από πολυαιθυλένιο

ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ

5 εβδομάδες στους 2/8°C

ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΝ ΑΝΤΙΓΟΝΟ

πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός της ημέρας. Δεν μπορεί να καταψυχθεί

ΣΥΖΥΓΕΣ

5 εβδομάδες στους 2/8°C

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C, 1 εβδομάδα σε 15/30°C στο σκοτάδι

ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ

έτοιμο για χρήση 2 εβδομάδες σε 2/8°C, 5 ημέρες σε 15/30 °C

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

## **6. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΟΔΗΓΙΕΣ**

**ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΤΕ ΣΤΟΥΣ 2-8°C**

### **Προσοχή:**

Αυτή η συσκευασία περιέχει υλικά ανθρώπινης προέλευσης που έχουν περάσει από ελέγχους και έχουν βρεθεί αρνητικά, σε εγκεκριμένα από την FDA τεστ, τόσο όσον αφορά την ανίχνευση του HbsAg όσο και για τα αντι σώματα αντι-HIV-1, αντι-HIV-2 και αντι-HCV. Επειδή κανένα διαγνωστικό τεστ δεν προσφέρει απόλυτη εγγύηση απουσίας μολυσματικών παραγόντων, κάθε υλικό ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να θεωρείται ως δυνητικά μολυσματικό. Χρησιμοποιείτε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα παίρνοντας όλες τις προφυλάξεις που προβλέπονται από τους κανονισμούς ασφαλείας του εργαστηρίου.

**Διαχείριση των κατάλοιπων:** τα δείγματα του ορού και ο αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να αντιμετωπίζονται ως κατάλοιπα δυνητικά μολυσματικά και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις ισχύουσες διατάξεις.

### **Οδηγίες για την προσωπική σας ασφάλεια**

7. Μην κάνετε αναρρόφηση με το στόμα. Χρησιμοποιείτε γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά όταν χειρίζεστε τα δείγματα. Πλένετε πολύ καλά τα χέρια σας μετά από κάθε ανάλυση.
8. Η περιεκτικότητα των παρακάτω αντιδραστηρίων σε βλαβερές ή ερεθιστικές ουσίες, είναι χαμηλή:
  - α) το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης περιέχει ουσίες καθαρισμού
  - β) το συζυγές περιέχει φαινόλη
  - γ) το υπόστρωμα είναι όξινο
  - δ) Οι βαθμονομητές περιέχουν Αζίδιο Νατρίου (0,09%) το οποίο μαζί με τον χαλκό και τον μόλυβδο μπορεί να σχηματίσει ισχυρά εκρηκτικά αζιδικά ιζήματα μετάλλων:  
Αν ένα αντιδραστήριο έρθει σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνετε με άφθονο νερό.
9. Οι συσκευές που δεν είναι μίας χρήσης, πρέπει να αποστειρώνονται, κατά προτίμηση στον κλίβανο, για 1 h σε 121°C, ενώ το υλικό μίας χρήσης πρέπει να μπαίνει στον κλίβανο ή να αποτεφρώνεται.
10. Το θεϊκό οξύ, που περιέχεται στο Stop Solution και το υδροχλωρικό οξύ που χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα του υάλινου εξοπλισμού, είναι διαβρωτικά και γι' αυτό πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή. Σε περίπτωση που έρθουν σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνετε με άφθονο νερό.
11. Εξουδετερωμένα οξέα και άλλα υγρά απόβλητα πρέπει να απολυμαίνονται προσθέτοντας υποχλωριώδες νάτριο, τόσο όσο χρειάζεται ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι τουλάχιστον 1%. Μια έκθεση σε υποχλωριώδες νάτριο 1% για 30 λεπτά, υπό κανονικές συνθήκες, είναι αρκετή για να γίνει μία αποτελεσματική απολύμανση.
12. Τυχόν χυμένα υγρά, δυνητικά μολυσματικά, πρέπει να καθαρίζονται αμέσως με απορροφητικό χαρτί και η επιφάνεια να απολυμαίνεται, για παράδειγμα με υποχλωριώδες νάτριο 1%, πριν να συνεχίσετε την διαδικασία ανάλυσης. Αν τα υγρά περιείχαν ένα οξύ, τότε στεγνώστε πολύ καλά την επιφάνεια πριν χρησιμοποιήσετε το υποχλωριώδες νάτριο. Όλα τα υλικά, που χρησιμοποιήθηκαν για να καθαριστούν τυχόν χυμένα υγρά, πρέπει να απορρίπτονται ως δυνητικά μολυσματικά απόβλητα. Μην βάζετε στον κλίβανο υλικά που περιέχουν υποχλωριώδες νάτριο.

### **Οδηγίες για την ανάλυση**

14. Πριν από την χρήση φέρτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C) Βάλτε και πάλι τα αντιδραστήρια στη συνιστώμενη θερμοκρασία αποθήκευσης, αμέσως μετά τη χρήση. **Η σωστή θερμοκρασία είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την επώαση των ταινιών. Βεβαιωθείτε ότι ο θερμοστάτης δεν κατεβαίνει κάτω από τους 35°C και δεν ανεβαίνει πάνω από τους 39°C.**

Ανοίξτε την σακούλα με τις ταινίες (strip) αφού την έχετε αφήσει τουλάχιστον μισή ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

15. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους. Να αποφεύγετε την μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων γιατί αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας του προϊόντος και μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
16. Μην αλλάξετε την όλη Διαδικασία και μην αντικαταστήσετε τα αντιδραστήρια με άλλα διαφορετικής μάρκας ή με άλλα από διαφορετικές παρτίδες, εκτός και αν το αντιδραστήριο είναι κοινό σε όλες τις παρτίδες. Μην μειώνετε τον υποδεικνυόμενο χρόνο επώασης.
17. Όλος ο υάλινος εξοπλισμός πρέπει να απολυμαίνεται προσεκτικά με υδροχλωρικό οξύ 2M και να ξεπλένεται με αποσταγμένο ή με απιονισμένο νερό.
18. Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε ισχυρό φωτισμό ούτε σε υποχλωριώδεις ατμούς, τόσο κατά την αποθήκευσή τους όσο και κατά την επώασή τους.
19. Οι κυψελίδες δεν πρέπει να ξεραίνονται, κατά την διάρκεια των τεστ.
20. Να αποφεύγετε την διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιείτε πάντοτε τις ειδικές πιπέτες.
21. Μην ακουμπάτε το χέιλος της κυψελίδας με το συζυγές. Μην φυσάτε πάνω στα μικροπλακίδια.
22. Οι ανοσοενζυμικές αναλύσεις μπορεί να παρουσιάσουν καμιά φορά στα άκρα ένα ειδικό φαινόμενο ("edge effect"), το οποίο μπορεί να ελαχιστοποιηθεί αυξάνοντας τον βαθμό υγρασίας κατά την επώαση. Τα πλακίδια πρέπει να καλύπτονται με το ειδικό κάλυμμα και να επωάζονται στους 37°C ή σε ζεστό υδατόλουτρο, τοποθετώντας τα πάνω σε ένα υποστήριγμα, ή στη συσκευή επώασης. Ως εναλλακτική λύση τα πλακίδια μπορεί να επωαστούν σε έναν κατάλληλο αναλύτη. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε το εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής. Μην χρησιμοποιείτε συσκευές επώασης που λειτουργούν με CO<sub>2</sub>.
23. Πριν από την ανάγνωση του πλακιδίου, βεβαιωθείτε ότι ο πυθμένας του είναι καθαρός και στεγνός και ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στην επιφάνεια του υγρού.
24. Τα δείγματα που παρουσιάζουν ισχυρή αιμόλυση, οροί με ατελή πήξη, ή δείγματα που παρουσιάζουν μικροβιακή μόλυνση, μπορεί να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα.
25. Η χρήση ενός κιτ με αυτόματες συσκευές, πρέπει να ελεγχθεί και να επικυρωθεί από τον χρήστη.
26. Διαβάστε με προσοχή το εγχειρίδιο χρήσης κάθε συσκευής που χρησιμοποιείτε, και ειδικά τα εξής σημεία:
  - εγκατάσταση και ειδικές προδιαγραφές
  - λειτουργική αρχή, οδηγίες, προφυλάξεις, κίνδυνοι
  - προδιαγραφές του κατασκευαστή και λειτουργικές αποδόσεις της συσκευής
  - συντήρηση και τεχνική υποστήριξη.

## **7. ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ**

Το δείγμα αποτελείται από ορό που προέρχεται από αίμα που έχει συλλεχθεί με φλεβική λήψη και έχει περάσει από όλες τις διαδικασίες που προβλέπονται από τους βασικούς κανονισμούς των εργαστηρίων. Ο νωπός ορός μπορεί να διατηρηθεί για 4 ημέρες στους 2/8°C, ενώ για μεγαλύτερη χρονική περίοδο καταψύξτε στους -20°C. Το δείγμα μπορεί να αποψυχθεί το πολύ 3 φορές. Αποφεύγετε τη χρήση αυτο-αποψυχόμενων ψυγείων για τη συντήρηση των δειγμάτων. Μετά από την απόψυξη και πριν να το ρίξετε στην κυψελίδα, ανακινήστε το καλά.. Η μικροβιακή μόλυνση μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα του δείγματος, και να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα.

Δείγματα με ισχυρή αιμόλυση, με ίκτερο, λιπαιμικά ή μολυσμένα, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται. **Το τεστ δεν μπορεί να γίνει πάνω σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος.**

## **8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

### **Τεχνική manual**

- Προετοιμάστε τις απαραίτητες ταινίες.
- Προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας το Wash Buffer 10x (100 ml + 900 ml H<sub>2</sub>O)
- Προετοιμάστε το ανοσοσύμπλοκο, κάνοντας την ανασύσταση του κρυο-αφυδατωμένου με το συζυγές (ο όγκος που είναι απαραίτητος υποδεικνύεται στην ετικέτα).

Αραιώστε τα δείγματα σε αναλογία 1:101 ρίχνοντας 10 μL ορού σε 1 mL διαλύτη. Αφήστε μία κυψελίδα ελεύθερη για την ανάλυση του τυφλού δείγματος, χρησιμοποιώντας μόνο 100 μL υποστρώματος. Ρίξτε 100 μL από κάθε αραιωμένο δείγμα σε κάθε κυψελίδα (σας συμβουλευούμε να κάνετε την ανάλυση εις διπλούν). Σε μία ταινία ρίξτε τους ορούς ελέγχου ΧΩΡΙΣ ΝΑ ΤΟΥΣ ΑΡΑΙΩΣΕΤΕ (100 μL ανά κυψελίδα). Η ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα είναι 1 ορός ελέγχου αρνητικός, 2 cut-off και 1 θετικός. Καλύψτε τις κυψελίδες με την προστατευτική ταινία και βάλτε τις να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C. Μετά από 4 εκπλύσεις, διάρκειας 30 δευτερολέπτων η κάθε μία (300 μl) προσθέστε 100 μL ανοσοσύμπλοκου (μονοκλωνικό αντιγόνο/αντίσωμα αντι-HSV σεσημασμένο με POD) σε κάθε μία κυψελίδα και βάλτε τις και πάλι να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C, καλύπτοντάς τις με την προστατευτική ταινία. Ξεπλύνετε και πάλι το πλακίδιο 4 φορές, όπως υποδεικνύεται παραπάνω, και στη συνέχεια ρίξτε το Υπόστρωμα, 100 μL/ανά κυψελίδα.. Μετά από 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος διακόψτε την ενζυμική αντίδραση με 100 μL Stop Solution. Διαβάστε την Απορρόφηση (Ο.Π) στα 450 nm ή στα 450/620 nm μέσα σε 30 λεπτά.

## 9. Διάγραμμα της ανάλυσης

### Τεχνική manual

- STEP 1 Ρίξτε 100 μL αραιωμένου ορού/ορών ελέγχου στις κυψελίδες της ταινίας  
-  
Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C  
-  
Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 μl)  
-  
STEP 2 Ρίξτε 100 μL ανοσοσυμπλόκου σε κάθε κυψελίδα  
-  
Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C  
-  
Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 μl)  
-  
STEP 3 Ρίξτε 100 μL Υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα  
-  
Επωάστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος  
-  
STEP 4 Προσθέστε 100 μL Stop Solution  
-  
Διαβάστε την Ο.Π. στα 450 nm μέσα σε 30 λεπτά.

### 10. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Αφαιρέστε την τιμή του τυφλού ( $\leq 0.150$ ) από όλες τις άλλες τιμές. Οι τιμές σε Ο.Π. του ορού ελέγχου Cut-off, όταν αναλύεται εις τριπλούν, πρέπει να κυμαίνονται μέσα στο 25% της μέσης τιμής. Απορρίψτε την μη φυσιολογική τιμή και υπολογίστε και πάλι την μέση τιμή. Ο θετικός ορός πρέπει να έχει Ο.Π. ίση τουλάχιστον με 1,5 φορά την τιμή του Cut-off. Ο λόγος μεταξύ Αρνητικού ορού και Cut-off πρέπει να είναι  $\leq 0.6$ . Η Ο.Π. του cut-off πρέπει να είναι  $\geq 0,2$  στα 450 nm και  $\geq 0,16$  στα 450/620 nm.

### 11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

#### Ποιοτικά αποτελέσματα

Αν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος είναι μεγαλύτερη από τον Cut-off το δείγμα προκύπτει θετικό λόγω της παρουσίας των ειδικών IgM.

Υπολογίστε τον λόγο μεταξύ της τιμής της Ο.Π. του υπό εξέταση δείγματος και εκείνης του Cut-off (INDEX). Το δείγμα θα κριθεί:

Θετικό: όταν ο λόγος είναι  $> 1.2$ .

Αμφίβολο:  $= \pm 20\%$  του Cut-off.

Αρνητικό: όταν ο λόγος είναι  $< 0.8$ .

Σε περίπτωση αμφίβολου αποτελέσματος, επαναλάβετε το τεστ. Αν το αποτέλεσμα παραμένει αμφίβολο επαναλάβετε την αιμοληψία.

### 12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

Όπως συμβαίνει σε πολλά ορολογικά τεστ, τα αποτελέσματα χρησιμεύουν απλώς ως ένδειξη για την διάγνωση και πρέπει να συνεκτιμούνται μαζί με άλλα δεδομένα από άλλα είδη αναλύσεων και ερευνών.

Για τον εντοπισμό της ορομετατροπής είναι απαραίτητη η συνδυασμένη ανάλυση των δειγμάτων. Το πρώτο δείγμα συλλέγεται αμέσως μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων, ενώ το δεύτερο μετά από 2-3 εβδομάδες. Αν το πρώτο δείγμα συλλεχθεί πολύ αργά, κατά την πορεία της λοίμωξης, η ορομετατροπή μπορεί να μην είναι δυνατόν να ανιχνευθεί. Αν οι τιμές των συνδυασμένων ορών δεν δίνουν ένα τελικό αποτέλεσμα, τότε πρέπει να γίνει μία νέα ανάλυση των δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα πρέπει να συνεκτιμούνται πάντοτε μαζί με άλλα που προέρχονται από κλινική εκτίμηση καθώς και από άλλες διαγνωστικές έρευνες.

### 13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Αναλύθηκαν 67 δείγματα ορών που περιείχαν δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες όπως:

- Αντιπυρηνικά Αντισώματα (ANA) (n=12)
- Ρευματοειδής Παράγοντας (n=8)

- Ετερόφιλα Αντισώματα (n=5)
- Χολερυθρίνη (n=9)
- Τριγλυκερίδια (n=10)
- IgM Κυτταρομεγαλοϊού (n=23)

Δεν παρουσιάστηκαν παρεμβολές σε καμία περίπτωση

#### 14. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Σε έναν εξωτερικό κλινικό πειραματισμό, αναλύθηκαν 313 δείγματα με το kit Diesse σε σύγκριση με μία εμπορική μέθοδο. Τα δείγματα στα οποία υπήρξε ασυμφωνία, αναλύθηκαν με μία τρίτη μέθοδο ανταγωνιστικής εταιρείας. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

|        | ΑΝΑΦΟΡΑ |     |
|--------|---------|-----|
|        | +       | -   |
|        | 43      | 6   |
| DIESSE | +       | 2   |
|        | -       | 262 |

Το kit Enzywell έδειξε ευαισθησία 95.6% και ειδικότητα 97.8%.

#### 15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Ακρίβεια κατά την ανάλυση

| Δείγμα                                       | HSM 1<br>(Αρνητικός<Cut Off) | HSM 2<br>(Θετικός>Cut Off) | HSM 3<br>(Θετικός) | Cut Off | Ορός<br>Ελέγχου<br>Θετικός |
|----------------------------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------|---------|----------------------------|
| <b>n</b><br>(επαναλαμβανόμενες<br>μετρήσεις) | 23                           | 24                         | 24                 | 12      | 12                         |
| <b>Ο.Π.</b>                                  | 0.202                        | 0.643                      | 0.816              | 0.638   | 1.404                      |
| <b>CV%</b>                                   | 23%                          | 14%                        | 8%                 | 15%     | 6%                         |

Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων

| Δείγμα                      | Index     |     |
|-----------------------------|-----------|-----|
|                             | Μέση Τιμή | CV% |
| <b>Ορός Ελέγχου Θετικός</b> | 5.8       | 6   |
| <b>HSM1</b>                 | 0.4       | 14  |
| <b>HSM2</b>                 | 1.2       | 13  |
| <b>HSM3</b>                 | 2.0       | 11  |

Ακρίβεια μεταξύ παρτίδων

| Δείγμα      | INDEX      |            |            | Μέση Τιμή | CV% |
|-------------|------------|------------|------------|-----------|-----|
|             | Lot n. 128 | Lot n. 129 | Lot n. 130 |           |     |
| <b>HSM1</b> | 0.4        | 0.4        | 0.3        | 0.4       | 16  |
| <b>HSM2</b> | 1.3        | 1.3        | 1.1        | 1.2       | 9   |
| <b>HSM3</b> | 2.2        | 1.9        | 1.7        | 1.9       | 13  |

**16. ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ**

| ΠΡΟΒΛΗΜΑ                              | ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ ΤΟΥ ΣΦΑΛΜΑΤΟΣ                                                         | ΤΙ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΚΑΝΕΤΕ                                                                                                                        |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα αρνητικά) | Δεν προστέθηκαν ένα ή περισσότερα αντιδραστήρια ή προστέθηκαν σε λανθασμένη σειρά. | Ελέγξτε και πάλι την όλη διαδικασία. Ελέγξτε μήπως δεν έχει προστεθεί κάποιο αντιδραστήριο. Επαναλάβετε το τεστ.                           |
|                                       | Το πλακίδιο δεν αντιδρά                                                            | Ελέγξτε τον κωδικό στον φάκελο του πλακιδίου (βλ. οδηγίες χρήσης σημείο 4 περί λανθασμένου κωδικού).                                       |
|                                       |                                                                                    | Ελέγξτε αν υπάρχουν ίχνη υγρασίας στο πλακίδιο που δεν αντιδρά. ( Η γέλη πυριτίας πρέπει να έχει χρώμα κίτρινο ώχρα). Επαναλάβετε το τεστ. |
| Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα θετικά)   | Μόλυνση του υποστρώματος                                                           | Πάρτε μία νέα ποσότητα υποστρώματος                                                                                                        |
|                                       | Ανεπαρκής έκπλυση                                                                  | Βεβαιωθείτε ότι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά.                                                                                       |
| Χαμηλό επίπεδο ακρίβειας              | Ανεπαρκής αναρρόφηση των κυψελίδων                                                 | Βεβαιωθείτε ότι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά                                                                                        |
|                                       | Λανθασμένη αναρρόφηση                                                              | Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας.                                                                                                         |
|                                       | Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται με πολύ αργό ρυθμό                                  | Να αποφεύγετε την ξήρανση του πλακιδίου μετά την έκπλυση. Προσθέστε αμέσως τα αντιδραστήρια                                                |
|                                       | Υπάρχουν φυσαλίδες αέρα                                                            | Να αποφεύγετε τον σχηματισμό φυσαλίδων κατά την αναρρόφηση.                                                                                |
|                                       | Η οπτική διαδρομή δεν είναι διαυγής                                                | Ελέγξτε αν η φωτεινή πηγή είναι καθαρή. Καθαρίστε με ένα χαρτομάντιλο το πλακίδιο                                                          |
| Ανεπαρκής θερμοκρασία                 | Λανθασμένος ο χρόνος ή η θερμοκρασία της επώασης                                   | Ελέγξτε τον θερμοστάτη και τον χρόνο επώασης.                                                                                              |
|                                       |                                                                                    | Ακολουθήστε πιστά τις οδηγίες χρήσης                                                                                                       |
|                                       | Η ποσότητα του υποστρώματος που έχει προστεθεί, δεν είναι αρκετή.                  | Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας                                                                                                          |

**17. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. S. Land et al.: Rapid diagnosis of herpes simplex virus infections by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 19: 865 (1984).
3. B. Gonik et al.: Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 29: 436 (1991).
4. C. Gleaves et al.: Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of herpes simplex virus (HSV) antigen from clinical specimens in viral transport media. J. Virological Meth. 28: 133 (1990).
5. M. Morgan and T. Smith: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 19: 730 (1984).
6. D. Ho et al.: Indirect ELISA for the detection of HSV-2 specific IgG and IgM antibodies with glycoprotein G (gG-2). J. Virological Meth. 36: 249 (1992).
7. R. Eberle et al.: The immune response to herpes simplex virus: comparison of the specificity and relative titers of serum antibodies directed against viral polypeptides following primary herpes simplex virus type 1 infections. J. Med. Virology 16: 1247 (1985).
8. J.E. Kuhn et al.: Analysis of the IgM and IgG antibody response against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) structural and nonstructural proteins. J. Medical Virology 23: 135 (1987).



## **INSTRUCCIONES DE USO**

### **ENZYWELL HERPES SIMPLEX 1+2 IgM**

**REF 91021**

**(Español)**

#### **1. INDICACIONES**

**KIT INMUNOENZIMÁTICO POR CAPTURA PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS IgM ANTI HERPES SIMPLEX VIRUS 1 + 2 EN SUERO HUMANO, COMO UNA AYUDA EN EL DIAGNÓSTICO DEL HERPES SIMPLEX VIRUS.**

#### **2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST**

El Herpes simplex virus (HSV) pertenece al grupo de los Herpesviridae del cual se conocen dos tipos: el tipo 1 (HSV-1) y el tipo 2 (HSV-2), que presentan diferencias antigénicas menores. El HSV-1 causa lesiones principalmente orofaciales, mientras que HSV-2 es principalmente responsable de lesiones genitales, pero esta distinción es sólo aproximada y ambos tipos pueden causar infecciones en ambos sitios anatómicos. HSV puede también causar una forma de queratitis ocular y lesiones del sistema nervioso central.

El HSV puede afectar prácticamente a toda la población. La infección primaria está a menudo en una forma subclínica y se diagnostica raramente. Después de un período de latencia de variable duración, la reactivación puede ocurrir y la réplica viral puede o no dar lugar a lesiones clínicas. La infección contraída durante el nacimiento es de interés particular, siendo causa importante de morbilidad y de mortalidad.

Por esta razón es importante determinar el título del estado inmunitario de la paciente durante el embarazo y observar la eventual sueroconversión. La presencia de IgM específicas es importante para la diagnóstico de infección neonatal y de encefalitis causadas por HSV. Por otra parte, la presencia de IgM específicas indica la actividad viral en progreso, aunque no permite distinguir entre la infección primaria y la reactivación.

#### **3. PRINCIPIO DEL MÉTODO**

La prueba sobre la titulación IgM anti Virus 'Herpes Simplex está basado en el principio de la captura de estas inmunoglobulinas y successiva revelación de las específicas, disfrutando de su capacidad de unir un antígeno conjugado a peroxidasa.

La captura se efectúa con anticuerpos monoclonales unidos en la fase sólida (pocillos de microtitulación). El antígeno está constituido por una mezcla de los 'Herpes Simplex Virus tipo 1 y 2, purificado e inactivo. El conjugado está compuesto por monoclonales específicos anti-HSV, marcados con peroxidasa.

#### **4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO**

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.

**Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.**

**MT PLATE** MICROPLACA 12x8 pocillos recubiertos de anticuerpos humanos monoclonales anti-IgM humanos

**Uso:** Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (M seguido por el número de lote) que sirve para su identificación; retirar el soporte y las tiras necesarias. Colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel de sílice; extraer el aire y cerrar fuertemente.

**CONTROL +** CONTROL POSITIVO 1x1.6 mL

**Contenido:** Suero humano diluido a concentración conocida de anticuerpos anti-HSV IgM, en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% % y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

**Color:** el color es proporcional al título del anticuerpo.

**CONTROL CUT-OFF** CONTROL CUT OFF 1x2.5 mL

**Contenido:** Suero humano diluido a concentración conocida de anticuerpos anti-HSV IgM, en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% % y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

**Color:** el color es proporcional al título del anticuerpo.

**Ag** ANTÍGENO Polvo liofilizado x 6 frascos

Contenido: Herpes Simplex Virus purificado, en tampón fosfato conteniendo lactosa.

Preparación: Reconstituir con el volumen de conjugado indicado en etiqueta, mezclando por inversión.

**CONJ** CONJUGADO 1 x 18 mL

Contenido: anticuerpos monoclonales marcados anti-HSV con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol 0.05% Y Bronidox 0.02%.

Preparación: Listo para su uso

El inmunocomplejo se tiene que preparar acerca de 45 minutos adelante

**CONTROL IgM -** IgM CONTROL NEGATIVO (PF93900) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

**WASH BUF 10x** TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Solución salina tamponada (PBS) concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.

Preparación: Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir.

**SAMP DIL 2** DILUYENTE 2 (PF93611) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Para la dilución de las muestras de suero.

Contenido: Solución de proteínas en tampón fosfato con ázida sódica 0.09% con adición de metilnaranja como conservante.

**SUBS TMB** SUBSTRATO (PF93619) 1x 12 mL Listo para su uso **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.01% estabilizados en tampón citrato 0,05 mol/L (pH 3.8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2).

BOLSA DE PLÁSTICO (1).

**MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS**

- Incubador a 37°-40°C
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linealidades hasta OD >= 2,000)
- Lavador de Microplacas (no indispensable)
- Agua Destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 10,100, 1000 µL de solución
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente

**5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS**

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja .

Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la abertura y/o de la preparación

| REACTIVO               | CONDICIONES                                                                |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| MICROPLACA             | 5 SEMANAS 2/8°C bolso de plástico                                          |
| CONTROL                | 5 SEMANAS 2/8°C                                                            |
| CONJUGADO              | 5 SEMANAS 2/8°C                                                            |
| ANTÍGENO RECONSTITUIDO | utilizar durante el día, no puede ser congelado                            |
| SUBSTRATO              | hasta la fecha de caducidad a 2/8°C, 1 semana a 15/30°C en ambiente oscuro |
| DILUYENTE MUESTRAS     | hasta la fecha de caducidad a 2/8°C                                        |
| TAMPÓN DE LAVADO       | listo para su uso 2 semanas 2/8°C, 5 días 15/30 °C                         |
| SOLUCIÓN BLOQUEANTE    | hasta la fecha de caducidad a 2/8°C,                                       |

## 6. PRECAUCIONES DE USO

### SOLAMENTE PARA USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO. CONSERVAR A 2-8°C

#### Cuidado:

Este kit contiene materiales de origen humano que han sido testados y dieron resultados negativos en las pruebas aprobadas por la FDA para la presencia de HbsAg y de los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-HCV. Dado que ninguna prueba diagnóstica puede ofrecer una completa garantía sobre la ausencia de agentes infecciosos, cualquier material de origen humano debe ser considerado potencialmente infeccioso. Todos los materiales de origen humano deben manipularse según las prácticas de seguridad comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.

**Desecho de los residuos: las muestras de suero y los reactivos se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, según disposiciones normativas vigentes.**

#### Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por vía oral. Usar los guantes de un solo uso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos a fondo después de terminar el test.
2. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
  - a) El tampón de lavado contiene detergentes
  - b) El conjugado contiene fenol
  - c) El sustrato es ácido
  - d) Los reactivos contienen Ázida Sódica (0.09%) que puede reaccionar con cobre y plomo y formar ázidas metálicas potencialmente explosivas.

Si cualquier reactivo entra en contacto con la piel u ojos, lavar con mucha agua.
3. Los aparatos no desechables se deben esterilizar después su uso. El método preferido es autoclavar durante 1 h a 121°C; los materiales desechables deben ser autoclavados o incinerados.
4. El ácido sulfúrico contenido en la Solución Bloqueante y el ácido clorhídrico usado para limpiar la cristalería son corrosivos; utilizar estos materiales con cuidado. En caso de contacto con la piel u ojos, limpiar con mucha agua.
5. Los ácidos neutralizados y los otros residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1,0%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1,0%, antes de que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada. Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

#### Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta. Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C ó por encima de 39°C..**
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
3. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
4. Lavar con ácido hidroc্লórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo..
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" ("efecto filo") que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador. Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO<sub>2</sub>.
10. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.

11. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación microbiana.
12. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.
13. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:
  - instalación y requisitos específicos
  - principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
  - especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
  - mantenimiento y servicio técnico

## **7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN**

El tipo de muestra es suero recogido normalmente de sangre venosa y manipulado con las apropiadas precauciones requeridas en la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar durante 4 días a 2/8°C. Para conservaciones más largas congelar a -20°C. Se puede descongelar un máximo de 3 veces. Las muestras no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes.

La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.

No utilizar muestras muy lipémicas, ictéricas, hemolizadas o contaminadas.

**El test no se puede aplicar a plasma humano.**

## **8. PROCEDIMIENTO**

### **Método Manual**

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el *Wash Buffer* 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).
- Preparar el antígeno reconstituyendo el liofilizado con el conjugado (volumen indicado en etiqueta).

Diluir las muestras 1:101 poniendo 10 µL de suero en 1 mL de diluyente, dispensar 100 µL de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los controles SIN DILUIR en una tira, preferiblemente por duplicado (100 µL para cada pocillo). El requisito mínimo indispensable es 1 negativo, 2 cut-off y 1 positivo. Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla sustrato.

Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 45 minutos a 37°C. Lavar 4 veces, dejando la solución de lavado en el pocillo 30 segundos (300 µL) cada ciclo. Añadir 100 µL de inmunocomplejo a cada pocillo (antígeno/anticuerpos monoclonales marcados con POD) e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora.. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo. Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante. Leer la Absorbancia (DO.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

|                                              |
|----------------------------------------------|
| <b>9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST</b> |
|----------------------------------------------|

### **Método Manual**

STEP 1 Poner 100 µL de la muestra diluida/controles en los pocillos.

-

-

Incubar 45 min. a 37°C

-

Lavar 4 veces

-

STEP 2 Añadir 100 µL de inmunocomplejo a cada pocillo

-

Incubar 45 min. a 37°C

-

Lavar 4 veces

-

STEP 3 Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo

-

Incubar 15 min. a T.A.

-

STEP 4 Añadir 100 µL de Solución Bloqueante

-

Leer la D.O a 450 nm dentro de 30 min

**10. VALIDACIÓN DEL TEST**

Restar el valor del blanco ( $\leq 0.150$ ) a todas las otras lecturas. Los valores en D.O. del suero de control Cut-off deben ser dentro del 25% del valor medio si testado en triple prueba. Descartar cualquier valor anormal y recalcular la media. El valor positivo debe tener D.O. igual por lo menos a 1.5 veces el Cut-off. La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser  $\leq 0.6$ . La D.O. del cut-off debe ser  $\geq 0.2$  a 450 nm e  $\geq 0.16$  a 450/620 nm.

**11. INTERPRETACIÓN DEL TEST****Resultados cualitativos**

Si el valor de la absorbancia de la muestra es superior al Cut-off la muestra resulta positiva por la presencia de IgM específicas para el antígeno.

Calcular la relación entre el valor de D.O. de la muestra y lo del Cut-off (INDEX).

La muestra se considera:

Inmune: si la concentración es  $> 1.2$ .

Dudoso:  $\pm 20\%$  del cut-off.

No-inmune: si la concentración es  $< 0.8$ .

Si el resultado es dudoso, repetir el test. Si el resultado continua siendo dudoso, recoger una nueva muestra de sangre.

**12. LIMITACIONES**

Como en el caso de muchas pruebas serológicas, los resultados sirven sólo como indicación para la diagnosis y deben ser interpretados siempre junto con otros tipos de diagnóstico.

Para determinar la sueroconversión es necesario titular dos muestras. La primera muestra se recoge lo antes posible después de que se produzcan los primeros síntomas, la segunda después de 2-3 semanas. Si la primera se recoge demasiado tarde durante el curso de la infección, la sueroconversión podría no ser demostrable. Si los resultados de los sueros en pareja no dan resultado definido, hay que titular otra vez las muestras.

Los resultados deben ser interpretados siempre junto con otros procedentes de evaluación clínica y otros procedimientos de diagnósticos.

**13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA**

Se analizaron 67 muestras de suero contenentes potenciales interferentes:

- Anticuerpos Antinúcleo (ANA) (n=12)
- Factor Reumatóideo (n=8)
- Anticuerpos eterófilos (n=5)
- Bilirubina (n=9)
- Triglicéridos (n=10)
- Cytomegalovirus IgM (23)

**14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO**

En una prueba clínica externa, se analizaron 313 muestras, con el kit Diesse en comparación con otro método inmunoenzimático comercial. Todas las muestras discrepantes eran analizadas con un tercer método comercial. Los resultados están resumidos en la tabla siguiente:

|        | REFERENCIA |     |
|--------|------------|-----|
|        | +          | -   |
|        | 43         | 6   |
| DIESSE |            |     |
| +      |            |     |
| -      | 2          | 262 |

El kit Enzywell tiene una sensibilidad del 95.6% y una especificidad del 97.8%.

**15. PRECISIÓN****Precisión intra-ensayo**

| Muestra        | HSM 1<br>(Negativo < Cut Off) | HSM 2<br>(Positivo > Cut Off) | HSM 3<br>(Positivo) | Cut Off | Control Positivo |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|---------|------------------|
| n (replicados) | 23                            | 24                            | 24                  | 12      | 12               |
| D.O.           | 0.202                         | 0.643                         | 0.816               | 0.638   | 1.404            |
| CV%            | 23%                           | 14%                           | 8%                  | 15%     | 6%               |

**Precisión en pruebas**

| Muestra                 | Index |     |
|-------------------------|-------|-----|
|                         | Media | CV% |
| <b>Control Positivo</b> | 5.8   | 6   |
| <b>HSM1</b>             | 0.4   | 14  |
| <b>HSM2</b>             | 1.2   | 13  |
| <b>HSM3</b>             | 2.0   | 11  |

**Precisión en lotes**

| Muestra     | INDEX      |            |            | Media | CV% |
|-------------|------------|------------|------------|-------|-----|
|             | Lot n. 128 | Lot n. 129 | Lot n. 130 |       |     |
| <b>HSM1</b> | 0.4        | 0.4        | 0.3        | 0.4   | 16  |
| <b>HSM2</b> | 1.3        | 1.3        | 1.1        | 1.2   | 9   |
| <b>HSM3</b> | 2.2        | 1.9        | 1.7        | 1.9   | 13  |

**16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS**

| PROBLEMA                          | POSSIBLES FUENTES DE ERROR                                                          | PRUEBA U ACCIONES                                                                                                        |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Serie no valida (todos negativos) | Uno o más reactivos no han sido añadidos o han sido añadidos en secuencia errónea . | Controlar de nuevo el procedimiento<br>Controlar si hay disoluciones que no se hayan utilizado.                          |
|                                   | Placa no reactiva                                                                   | Controlar el código del envase de la placa (ver punto 4 de la información técnica para el código correcto).              |
|                                   |                                                                                     | Controlar la presencia de humedad en la placa no utilizada. (El gel de sílice debe ser amarillo pálido) Repetir el test. |
| Serie no válida (todos positivos) | Contaminación del sustrato                                                          | Recoger una nueva alícuota de sustrato.                                                                                  |
|                                   | Lavado inadecuado                                                                   | Asegurarse del buen funcionamiento del lavador                                                                           |
| Escasa precisión                  | Aspiración incompleta de los pocillos                                               | Asegurarse del buen funcionamiento del lavador                                                                           |
|                                   | Aspiración inadecuada de los pocillos                                               | Asegurarse del buen funcionamiento del lavador                                                                           |
|                                   | Error de pipeteado                                                                  | Controlar el funcionamiento de la pipeta                                                                                 |
|                                   | Adición de los reactivos demasiado lenta                                            | Evitar la sequedad de la placa después del lavado. Añadir los reactivos inmediatamente.                                  |
|                                   | Presencia de burbujas                                                               | Evitar la formación de burbujas mientras se pipetea                                                                      |
|                                   | Sistema óptico no limpio                                                            | Controlar la fuente de luz y el detector para la presencia de suciedad . Limpiar el fondo de la placa con papel suave.   |
| Desarrollo escaso del color       | Tiempo o temperatura de incubación incorrectos                                      | Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.                                                        |
|                                   |                                                                                     | Seguir cuidadosamente las instrucciones.                                                                                 |
|                                   | Volumen inadecuado de sustrato añadido a la placa                                   | Controlar el funcionamiento de la pipeta.                                                                                |

**17. BIBLIOGRAFÍA**

- 1.G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
- 2.S. Land et al.: Rapid diagnosis of herpes simplex virus infections by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 19: 865 (1984).
- 3.B. Gonik et al.: Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 29: 436 (1991).
- 4.C. Gleaves et al.: Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of herpes simplex virus (HSV) antigen from clinical specimens in viral transport media. J. Virological Meth. 28: 133 (1990).
- M. Morgan and T. Smith: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 19: 730 (1984).
- 5.D. Ho et al.: Indirect ELISA for the detection of HSV-2 specific IgG and IgM antibodies with glycoprotein G (gG-2). J. Virological Meth. 36: 249 (1992).
- 6.R. Eberle et al.: The immune response to herpes simplex virus: comparison of the specificity and relative titers of serum antibodies directed against viral polypeptides following primary herpes simplex virus type 1 infections. J. Med. Virology 16: 1247 (1985).
- 7.J.E. Kuhn et al.: Analysis of the IgM and IgG antibody response against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) structural and nonstructural proteins. J. Medical Virology 23: 135 (1987).



## INSTRUCTIONS POUR L'UTILISATION

### ENZYWELL

### HERPES SIMPLEX 1+2 IgM

**REF** 91021

(Français)

#### 1. UTILISATION

**METHODE IMMUNOENZYMATIQUE A CAPTURE POUR LA DETERMINATION QUALITATIVE DES ANTICORPS IgM ANTI-HERPES SIMPLEX VIRUS (TYPES 1 ET 2) DANS LE SERUM HUMAIN, EN TANT QU'AIDE AU DIAGNOSTIC D'UNE INFECTION DUE A L'HERPES SIMPLEX VIRUS**

#### 2. INTERET CLINIQUE

Le virus de l'Herpes Simplex (HSV) fait partie de la famille des *Herpesviridae*, dont on connaît deux types : le type I (HSV-1) et le type II (HSV-2) que l'on peut distinguer par quelques différences antigéniques mineures. L'HSV-1 est responsable surtout des lésions orales et faciales, alors que l'HSV-2 provoque les lésions génitales, mais cette distinction est seulement approximative et chaque type peut provoquer l'infection des deux localisations. De plus, l'HSV peut provoquer une forme de kératite oculaire et les lésions du système nerveux central. L'HSV peut frapper virtuellement toute la population. L'infection primaire est souvent présente sous une forme sub-clinique et elle est rarement diagnostiquée. Après une période de latence ayant une durée variable, des phénomènes de réactivation se produisent avec la réplication virale, parfois associée à des lésions cliniques. L'infection contractée à la naissance est responsable d'une morbidité et d'une mortalité significatives.

L'évaluation de l'état immunitaire de la femme pendant la grossesse peut être importante afin de détecter une éventuelle séroconversion. Le titrage des IgM spécifiques est important pour le diagnostic de l'infection néonatale et de l'encéphalite provoquée par l'HSV. La présence des IgM spécifiques indique aussi une activité virale en cours même s'il n'est pas possible de faire la distinction entre l'infection primaire et la réactivation.

#### 3. PRINCIPE

Le test pour le dosage des IgM anti-HSV est basé sur le principe de la capture de ces immunoglobulines et leur détermination, en exploitant leur capacité de lier un antigène conjugué à la peroxydase. La capture se réalise en utilisant des anticorps monoclonaux liés à la phase solide (puits sur la plaque). L'antigène se constitue d'un mélange de l'HSV du type I et du type II purifiés et inactifs. Le conjugué se constitue d'anticorps monoclonaux spécifiques anti-HSV marqués avec la peroxydase.

#### 4. CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS

- Un kit permet de réaliser 96 déterminations.
- **Laisser les réactifs revenir à la température ambiante avant l'utilisation.**

**MT PLATE** MICROPLAQUE 12 x 8 puits sensibilisés avec des anticorps monoclonaux anti-IgM humaines

Utilisation: Découper le sachet du côté opposé au code (M, suivi par le numéro du lot) qui sert à son identification. Sortir le support et les barrettes nécessaires du papier d'emballage et placer les barrettes non utilisées dans le sachet en plastique avec le gel de silice. Chasser l'air du sachet et le fermer en exerçant une pression sur la fermeture.

**CONTROL +** CONTROLE POSITIF 1 x 1.6 mL

Composition: Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgM anti-HSV, dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1% de BSA et 0.09% d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

Couleur : la couleur dépend du titre en anticorps.

**CONTROL CUT-OFF** CONTROLE SEUIL 1 x 2.5 mL

Composition: Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgM anti-HSV, dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1% de BSA et 0.09% d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

Couleur : la couleur dépend du titre en anticorps.

**Ag** ANTIGENE lyophilisé, x 6 flacons.

Composition : Herpes Simplex Virus purifié, en tampon phosphate contenant du lactose.

Préparation : Reconstituer avec le volume de conjugué indiqué sur l'étiquette et agiter en renversant.

**CONJ** CONJUGUE 1 x 18 mL

Composition : Anticorps monoclonaux marqués à la peroxydase, dans un tampon phosphate contenant 0.05 % de phénol et 0.02 % de bronidox.

Préparation : Prêt à l'emploi.

L'immunocomplexe doit être préparé 45 minutes avant l'emploi.

**CONTROL IgM -** CONTROLE NEGATIF IgM (PF93900) 1 x 1.6 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : Sérum humain dilué dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1 % de BSA et 0.09 % d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

**WASH BUF 10x** TAMPON DE LAVAGE 10X (PF93603) 1 x 100 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : Solution saline tamponnée, concentrée 10 fois ; contient 0.5 % de brij.

Préparation : Diluer à 1/10 avec de l'eau distillée pour obtenir un tampon de lavage prêt à l'emploi.

En présence de cristaux : chauffer la solution à **37 °C** pour les solubiliser, puis réaliser la dilution.

**SAMP DIL 2** DILUANT 2 (PF93611) 1 x 100 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Pour diluer les échantillons de sérum.

Composition : Solution protéique, additionnée d'azide de sodium 0.09 % et de méthylorange en guise de colorant.

**SUBS TMB** SUBSTRAT (PF93619) 1 x 12 mL Prêt à l'emploi **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : Tétraméthylbenzidine (à 0.26 mg/mL) et peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0.01 %) stabilisé dans un tampon citrate (à 0.05 mol/l). pH = 3.8.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** SOLUTION D'ARRET (PF93602) 1 x 16 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (à 0.3 mol/l) en solution prête à l'emploi.

SACHET EN POLYETHYLENE (1)

FEUILLES ADHESIVES (2)

#### MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Incubateur à 37 °C
- Lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 ou 450/620 nm et 405 nm avec linéarité jusqu'à 2 000)
- Laveur de microplaques (recommandé) capable de fournir des volumes de 225-375 µl
- Eau distillée ou désionisée
- Verrerie normale de laboratoire (éprouvettes, pipettes, etc...)
- Micropipettes pour le prélèvement précis de 10, 100, 1000 µL de solution
- Gants à usage unique
- Chronomètre
- Solution d'hypochlorure de sodium (5 %)
- Récipients pour les matériaux potentiellement infectieux
- Papier absorbant

#### 5. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver les réactifs à +2-8 °C. La date de péremption est imprimée sur chaque flacon et sur l'étiquette du kit.

**Les réactifs ont une stabilité limitée après l'ouverture et/ou la préparation.**

##### REACTIF

MICROPLAQUE

CONTROLES

CONJUGUE

ANTIGENE RECONSTITUE

SUBSTRAT

DILUANT

TAMPON DE LAVAGE

SOLUTION D'ARRET

##### CONDITIONS

5 semaines à 2/8 °C, sachet en polythène.

5 semaines à 2/8 °C.

5 semaines à 2/8 °C.

Il doit être utilisé dans la journée et ne peut pas être congelé.

jusqu'à péremption à 2/8 °C, 1 semaine à 15/30 °C, dans l'obscurité.

jusqu'à péremption à 2/8 °C.

prêt à l'emploi 2 semaines à 2/8 °C, 5 jours à 15/30 °C

jusqu'à péremption à 2/8 °C.

## **6. PRECAUTIONS D'UTILISATION** **POUR DIAGNOSTIC IN VITRO.**

### **ATTENTION :**

**Ce kit contient des matériaux d'origine humaine. Les réactifs contenant du matériel d'origine humaine ont été contrôlés et trouvés négatifs en ce qui concerne les anticorps anti-VIH-1/VIH-2, anti-VHC et l'antigène HBs (selon la méthode FDA). Cependant, ils doivent être considérés comme étant potentiellement infectieux et, par conséquent, maniés avec précaution.**

**Elimination des résidus: les échantillons de serum et les réactifs usages doivent être traités comme des déchets infectés, et donc éliminés conformément aux dispositions de loi en vigueur.**

### **PRECAUTIONS DE SECURITE**

1. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des gants à usage unique et des lunettes de protection lors du maniement des échantillons et pendant l'exécution du test. Se laver soigneusement les mains après le maniement.
2. Les réactifs suivants contiennent de faibles concentrations de substances nocives ou irritantes :
  - a) Le tampon de lavage contient des détergents.
  - b) Le conjugué et les contrôles contiennent du phénol.
  - c) Le substrat est acide.
  - d) Les contrôles contiennent de l'azide de sodium (0.09 %). Les azides peuvent réagir avec les métaux (cuivre et plomb) des canalisations et former ainsi des composés explosifs.

En cas de contact avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
3. Tout matériel non jetable doit être stérilisé après son utilisation, de préférence en autoclave à 121 °C pendant 1 h. Tout matériel jetable doit être autoclavé ou incinéré après son utilisation.
4. L'acide sulfurique contenu dans la solution d'arrêt et l'acide chlorhydrique utilisé pour laver la verrerie sont corrosifs ; ces substances doivent être utilisées avec prudence. En cas de contact avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
5. Les acides neutralisés et les déchets liquides doivent être décontaminés avec une quantité suffisante de solution d'hypochlorure de sodium pour que la concentration finale soit de 1 % minimum. Un contact de 30 minutes avec cette solution est nécessaire pour garantir une décontamination efficace.
6. En cas de renversement accidentel de matériaux potentiellement infectieux, essuyer immédiatement avec du papier absorbant et nettoyer le plan de travail avec, par exemple, de l'hypochlorure de sodium (1 %), avant de continuer le test. En présence d'un acide, veiller à bien essuyer le plan de travail avant d'utiliser de l'hypochlorure de sodium. Tout matériel (notamment les gants) souillé par d'éventuelles éclaboussures doit être considéré comme étant potentiellement infectieux et éliminé selon la réglementation en vigueur.

### **PRECAUTIONS ANALYTIQUES**

1. Laisser les réactifs et les échantillons revenir à la température ambiante (+18-30 °C) avant leur utilisation. Aussitôt après leur utilisation, conserver les réactifs à la température de conservation recommandée. Il est très important de contrôler la température d'incubation des microplaques. Le thermostat ne doit ni descendre au-dessous de 35 °C, ni monter au dessus de 39 °C. Laisser le sachet contenant les barrettes revenir à la température ambiante pendant 30 minutes avant de l'ouvrir.
2. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption. Eviter toute contamination microbienne des réactifs susceptible d'affecter les résultats.
3. Ne pas modifier le mode opérationnel indiqué, ni remplacer les réactifs par d'autres provenant de lots ou de fournisseurs différents (à moins que cela ne soit spécifié sur la notice d'utilisation). Se référer au paragraphe « CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS ». Ne pas réduire les temps d'incubation indiqués.
4. Toute verrerie utilisée pour le test doit être lavée soigneusement avec de l'acide chlorhydrique (2M) et rincée à l'eau distillée ou désionisée.
5. N'exposer les réactifs ni à une forte lumière, ni aux vapeurs d'hypochlorure pendant leur conservation ou pendant les phases d'incubation.
6. Eviter le dessèchement des puits pendant le test.
7. Eviter la contamination croisée entre les réactifs. Il est important d'utiliser des pipettes différentes pour chaque réactif.
8. Eviter de toucher ou d'éclabousser le bord du puits avec le conjugué. Ne pas souffler sur les microplaques.
9. Les dosages immunoenzymatiques présentent parfois un « effet de bord » (« edge effect ») ; cet effet peut être minimisé en augmentant l'humidité pendant les phases d'incubation. Les microplaques doivent être couvertes avec un couvercle et incubées à 37 °C soit au bain-marie, soit dans un incubateur ou dans une analyseur adapté. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO<sub>2</sub>.

10. Avant de lire la microplaque, veiller à ce que le fond de la microplaque soit propre et sec et qu'il n'y ait aucune bulle d'air à la surface du liquide.
11. Les échantillons fortement hémolysés, les sérums incomplètement coagulés, ou les échantillons présentant une contamination microbienne peuvent causer des résultats erronés.
12. L'utilisation du kit avec les instruments automatiques doit être validée par l'utilisateur.
13. Lire attentivement le manuel d'utilisation des instruments utilisés ; en particulier les chapitres concernant :
  - L'installation et les précautions spécifiques.
  - Le principe, les instructions, les précautions et les risques d'utilisation.
  - Les spécifications du fabricant et les performances de l'instrument.
  - La maintenance.

## **7. TYPE D'ÉCHANTILLON ET CONSERVATION**

Utiliser des échantillons de sérum frais ou décongelé. Les échantillons peuvent être stockés à +2...+8 °C pendant 4 jours. Pour un stockage plus long, congeler les sérums à – 20 °C. Peut subir jusqu'à un maximum de trois décongelations. Éviter l'utilisation de l'espace de congélateur à dégivrage automatique pour le stockage des échantillons. Les sérums décongelés doivent être bien agités avant d'être utilisés. La non-activation à la chaleur peut provoquer des résultats erronés.

Les échantillons qui présentent une contamination microbienne peuvent fausser les résultats. Ceux qui sont fortement lipémiques, ictériques ou contaminés ne doivent pas être utilisés.

**Ne pas utiliser d'échantillon de plasma humain.**

## **8. PROCEDURE**

### **Préparation :**

- Préparer le nombre nécessaire de barrettes.
- Préparation de la solution tamponnée de lavage :  
Diluer la solution de lavage concentrée (par exemple : 100 mL + 900 mL d'eau distillée).
- Préparation de l'antigène en reconstituant le lyophilisé avec le conjugué (volume reporté sur l'étiquette).

### **Exécution**

Diluer les échantillons 1 :101 en versant 10 µl de sérum dans 1 mL de diluant ; distribuer 100 µl de chaque échantillon dilué dans les puits (il est conseillé d'effectuer l'analyse en double). Mettre les contrôles NON dilués (100 µl/puits) dans une barrette. Le numéro minimum indispensable est 1 négatif et positif et 2 seuil. Utiliser un puits pour effectuer le blanc, en ajoutant seulement 100 µl de substrat par puits. Couvrir les puits avec la feuille de protection.

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C. Laver pendant 30 secondes (300 µl), répéter la phase de lavage 4 fois. Ajouter 100 µl de l'immunocomplexe (antigène/anticorps monoclonaux marqués à la peroxydase) dans chaque puits.

Couvrir les puits avec la feuille de protection. Incuber pendant 45 minutes à 37 °C. Laver la plaque encore 4 fois comme cela est mentionné précédemment. Distribuer le substrat (100 µl / puits). Incuber 15 minutes à température ambiante. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt.

Lire la densité optique à 450 nm ou à 450/620 nm dans les 30 minutes.

|                            |
|----------------------------|
| <b>9. SCHEMA D'ANALYSE</b> |
|----------------------------|

1e ETAPE      Mettre 100 µl de sérum dilué/contrôles dans les puits de la barrette.

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.

Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl)

2e ETAPE      Mettre 100 µl de l'immunocomplexe dans les puits

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.

Laver pendant 30 seconde à 4 reprises (300 µL)

3e ETAPE      Mettre 100 µl de substrat dans les puits.

Incuber pendant 15 minutes à la température ambiante.

4e ETAPE      Ajouter la solution d'arrêt, 100 µl dans chaque puits.

Lire la densité optique à 450 nm dans les 30 minutes.

**10. VALIDATION DU TEST - CONTROLE QUALITE**

Lire les absorptions à 450 nm et en déduire la valeur de la D.O du blanc ( $\leq 0.150$ ).

Calculer les valeurs du contrôle seuil. Aucune valeur ne doit s'écarter de plus de  $\pm 25\%$  de la valeur moyenne si l'analyse est faite en triple; sinon éliminer la valeur aberrante. Recalculer la moyenne.

Le contrôle positif doit avoir une D.O 1,5 fois supérieure à celle du sérum seuil.

Le rapport des D.O du contrôle négatif et du sérum seuil doit être  $\leq 0.6$ .

La D.O. du contrôle seuil doit être  $\geq 0.2$  à 450 nm et  $\geq 0.16$  à 450/620 nm.

**11. INTERPRETATION DES RESULTATS****Résultats qualitatifs**

Si la valeur de l'O.D. du sérum est supérieure au sérum seuil, l'échantillon est positif en présence d'IgM spécifiques contre l'HSV.

Calculer le rapport entre la valeur d'absorption de l'échantillon et celle du seuil (Index).

L'échantillon est considéré comme étant :

Positif : si le rapport est  $> 1.2$

Incertain: si le rapport est compris 0.8 et 1.2

Négatif : si le rapport est  $> 0.8$

**Si le résultat est incertain, refaire le test. Si le résultat est de nouveau incertain, réaliser de nouveaux prélèvements d'échantillons de sang.**

**12. LIMITES DE LA METHODE**

Comme dans le cas de plusieurs autres test sérologiques, les résultats obtenus servent seulement en tant que support pour le diagnostic et ils doivent être interprétés en tenant compte d'autres observations. Pour déterminer la séroconversion, il faut doser des échantillons accouplés. Prélever le premier échantillon au plus tôt après le début des symptômes, et le second 2-3 semaines plus tard. Si le premier échantillon est prélevé trop tard pendant le cours de l'infection, la séroconversion pourrait ne pas avoir lieu. Si les résultats obtenus pour les échantillons accouplés ne sont pas concluants, doser de nouveau les sérums.

**13. SPECIFICITE ANALYTIQUE**

67 échantillons de sérum contenant des facteurs potentiellement interférents ont été testés.

- Anticorps anti-noyau (ANA) (12)
- Facteur rhumatoïde (8)
- Anticorps hétérophiles (5)
- Bilirubine (9)
- Triglycérides (10)
- Cytomégalovirus IgM (23)

Aucune interférence n'a été observée.

**14. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES**

Dans une expérimentation clinique, effectuée dans un laboratoire hospitalier, 313 échantillons ont été analysés avec la méthode Enzywell et avec une autre méthode immunoenzymatique disponible sur le marché. Tous les échantillons discordants ont été analysés avec une troisième méthode de la concurrence. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous :

|        |   | REFERENCE |     |
|--------|---|-----------|-----|
|        |   | +         | -   |
|        |   | 43        | 6   |
| DIESSE | + |           |     |
|        | - | 2         | 262 |

Le kit Enzywell a une sensibilité de 95.6 % et une spécificité de 97.8 %.

**15. PRECISION****Précision dans la série**

| Echantillon        | HSM 1<br>(Négatif<Seuil) | HSM 2<br>(Positif>Seuil) | HSM 3<br>(Positif) | Seuil | Contrôle Positif |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|-------|------------------|
| n<br>(répétitions) | 23                       | 24                       | 24                 | 12    | 12               |
| O.D.               | 0.202                    | 0.643                    | 0.816              | 0.638 | 1.404            |

|      |      |      |     |      |     |
|------|------|------|-----|------|-----|
| CV % | 23 % | 14 % | 8 % | 15 % | 6 % |
|------|------|------|-----|------|-----|

**Précision inter-séries**

|                         | Rapport Normal |      |
|-------------------------|----------------|------|
|                         | Moyen          | CV % |
| <b>Contrôle Positif</b> | 5.8            | 6    |
| <b>HSM1</b>             | 0.4            | 14   |
| <b>HSM2</b>             | 1.2            | 13   |
| <b>HSM3</b>             | 2.0            | 11   |

**Précision inter-lots**

| Echantillon | INDEX      |            |            | Moyen | CV% |
|-------------|------------|------------|------------|-------|-----|
|             | Lot n. 128 | Lot n. 129 | Lot n. 130 |       |     |
| <b>HSM1</b> | 0.4        | 0.4        | 0.3        | 0.4   | 16  |
| <b>HSM2</b> | 1.3        | 1.3        | 1.1        | 1.2   | 9   |
| <b>HSM3</b> | 2.2        | 1.9        | 1.7        | 1.9   | 13  |

**16. RESOLUTION DES PROBLEMES**

| PROBLEME                                                                                 | CAUSES POSSIBLES                                                                        | ACTION/CONTROLE                                                                                                                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Série non valable (tous les résultats sont négatifs y compris celui du Contrôle-positif) | Absence d'un ou de plusieurs réactifs, ou erreur de maniement dans l'ajout des réactifs | Contrôler le protocole.<br>Contrôler s'il y a une solution inutilisée. Refaire le test.                                                                   |
|                                                                                          | Plaque non réactive                                                                     | Contrôler le code imprimé sur le sachet de la plaque (lire les instructions d'utilisation, paragraphe 4).                                                 |
|                                                                                          |                                                                                         | Contrôler, sur une microplaque inutilisée, si elle a été exposée à l'humidité. (Le gel de silice doit présenter une couleur jaune pâle). Refaire le test. |
| Série non valable (tous les résultats sont positifs y compris celui du Contrôle-négatif) | Contamination du substrat                                                               | Prélever une nouvelle quantité de substrat.                                                                                                               |
|                                                                                          | Lavage insuffisant                                                                      | S'assurer que le laveur fonctionne correctement.                                                                                                          |
| Précision insuffisante                                                                   | Lavage incomplet des puits                                                              | S'assurer que le laveur fonctionne correctement.                                                                                                          |
|                                                                                          | Aspiration insuffisante des puits                                                       | S'assurer que le laveur fonctionne correctement.                                                                                                          |
|                                                                                          | Erreur de pipetage                                                                      | S'assurer que la pipette fonctionne correctement                                                                                                          |
|                                                                                          | Délai trop long pour la distribution des réactifs                                       | Eviter le dessèchement de la plaque après la phase de lavage. Ajouter immédiatement les réactifs.                                                         |
|                                                                                          | Présence de bulles d'air                                                                | Eviter la formation de bulles d'air pendant le pipetage.                                                                                                  |
|                                                                                          | Présence d'impuretés sur le parcours optique                                            | Contrôler l'absence d'impuretés sur la source lumineuse et le détecteur. Essuyer le fond de la microplaque avec un chiffon doux.                          |
| Développement insuffisant de la couleur                                                  | Temps ou température d'incubation non correct                                           | Vérifier le contrôle de la température et du temps d'incubation                                                                                           |
|                                                                                          |                                                                                         | Suivre attentivement les instructions d'utilisation.                                                                                                      |
|                                                                                          | Volume de substrat ajouté incorrect                                                     | Contrôler le fonctionnement de la pipette.                                                                                                                |

**17. BIBLIOGRAPHIE**

17. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
18. S. Land et él.: Rapid diagnosis of herpes simplex virus infections by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 19: 865 (1984).
19. B. Gonik et él.: Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 29: 436 (1991).

20. C. Gleaves et él.: Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of herpes simplex virus (HSV) antigen from clinical specimens in viral transport media. *J. Virological Meth.* 28: 133 (1990).
21. M. Morgan and T. Smith: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of herpes simplex virus antigen. *J. Clin. Microbiol.* 19: 730 (1984).
22. D. Ho et él.: Indirect ELISA for the detection of HSV-2 specific IgG and IgM antibodies with glycoprotein G (gG-2). *J. Virological Meth.* 36: 249 (1992).
23. R. Eberle et él.: The immune response to herpes simplex virus: comparison of the specificity and relative titers of serum antibodies directed against viral polypeptides following primary herpes simplex virus type 1 infections. *J. Med. Virology* 16: 1247 (1985).
24. J.E. Kuhn et él.: Analysis of the IgM and IgG antibody response against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) structural and nonstructural proteins. *J. Medical Virology* 23: 135 (1987).



## INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

### ENZYWELL HERPES SIMPLEX 1+2 IgM

**REF** 91021

(Português)

#### **1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA**

**MÉTODO DE CAPTURA MONO-ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE ANTICORPOS DE CLASSE IgM DE HERPES SIMPLEX (TIPOS 1 E 2) NO SORO HUMANO, COMO UMA AJUDA NO DIAGNÓSTICO DE HERPES SIMPLEX.**

#### **2. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE**

O vírus de Herpes simplex (HSV) é um membro da família Herpesviridae, onde se conhecem dois tipos: tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2) que apresentam diferenças antigénicas ligeiras. O HSV-1 provoca lesões orais e faciais, enquanto que o HSV-2 é sobretudo responsável por lesões genitais, mas a distinção não é estrita, com ambos os tipos a provocarem infecções noutros locais anatómicos. O HSV também pode provocar uma forma de queratite ocular, e lesões no sistema nervoso central.

O HSV pode afectar praticamente toda a população. A infecção primária é frequentemente de forma subclínica e é raramente diagnosticada. Após um período de incubação de duração variável, a reactivação pode ocorrer e a replicação pode levar ou não a lesões clínicas. A infecção contraída durante o parto é de interesse particular, sendo uma causa importante de morbilidade e mortalidade. É por isso importante determinar o estado imunitário das mulheres durante a gravidez para detectar a seroconversão. O ensaio de IgM específico é importante para o diagnóstico de infecção neonatal e encefalite provocadas por HSV. Além disto, a presença de IgM específico demonstra actividade viral em progresso, apesar de não ser possível distinguir entre infecções primárias e reactivações.

#### **3. PRINCÍPIO DO TESTE**

O teste para ensaio de IgM HSV é baseado no princípio da captura destas imunoglobulinas e a subsequente identificação das que são específicas, fazendo uso da habilidade para ligar um antígeno conjugado à peroxidase (1-8). A captura é efectuada usando anticorpos monoclonais ligados à fase sólida (poços de microtitulação). O antígeno é composto de HSV tipo 1 e 2 purificados, inactivados. O conjugado é composto de anticorpos monoclonais anti-HSV marcados com peroxidase.

#### **4. CONTEÚDO DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE**

- Os reagentes são suficientes para 96 determinações.

**Ponha à temperatura ambiente antes da utilização.**

**MT PLATE** MICROPLACA. 12x8 poços cobertos com anticorpos monoclonais IgM anti-humanos.

**Utilização:** abra a embalagem no lado oposto do código (M mais o número do lote), retire o suporte e as barras da embalagem folheada para serem usadas, e coloque as barras não usadas no saco de polietileno com gel de sílica, retire o ar e vede premindo o fecho.

**CONTROL +** CONTROLO POSITIVO 1 x 1.6 mL

**Conteúdo:** O soro humano, num tampão fosfatado 0.01 mol/L com ESA 1% e azida de sódio 0.09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

**Cor:** a cor dos calibradores é proporcional ao grau relativo de anticorpos.

**CONTROL CUT-OFF** CONTROLO DIRECTO 1 x 2.5 mL

**Conteúdo:** O soro humano, num tampão fosfatado 0.01 mol/L com ESA 1% e azida de sódio 0.09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

**Cor:** a cor dos calibradores é proporcional ao grau relativo de anticorpos.

**Ag** ANTIGÉNIO Pó seco-congelado x 6 frascos

**Conteúdo:** Vírus purificado de Herpes Simplex, num tampão fosfatado com lactose.

**Preparação:** reconstitua com volume conjugado mostrado na etiqueta, misturando por inversão.

**CONJ** CONJUGADO 1 x 18 mL

**Conteúdo:** anticorpos monoclonais marcados com peroxidase, numa solução tampão fosfatada contendo fenol 0,05% e Bronidox 0,02%.

**Preparação:** Prontos a usar.

O imunocomplexo deve ser preparado uns 45 min. antes de utilização.

**CONTROL IgM -** IgM CONTROLO NEGATIVO (PF93900) 1 x 1.6 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

**Conteúdo:** O soro humano, num tampão fosfatado 0,01 mol/L com ESA 1% e azida de sódio 0,09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

**WASH BUF 10x** TAMPÃO DE LAVAGEM 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

**Conteúdo:** Tampão fosfatado salino, concentrado 10 vezes, contendo Brij 0.5%.

**Preparação:** diluir o volume requerido 1:10 com água destilada para obtenção do tampão de lavagem pronto a ser usado. Se houver cristais, devem ser dissolvidos a 37°C antes da diluição.

**SAMP DIL 2** DILUENTE 2 (PF93611) 1x100 mL Para diluição de amostras de soro **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

**Conteúdo:** Solução proteica em tampão fosfatado com azida de sódio a 0,09% adicionado de metil-orange como corante.

**SUBS TMB** SUBSTRATO (PF93619) 1x 12 mL Prontos a usar **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

**Conteúdo:** Tetrametilbenzidina a 0.26 mg/mL e peróxido de hidrogénio a 0.01% estabilizado num tampão de citrato a 0.05 mol/L (pH 3.8).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M** SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602) 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 mol/L, em solução pronta a ser usada.

PELÍCULAS ADESIVAS (2).

SACO DE POLIETILENO (1).

#### MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Incubador a 37°C
- Leitor de microplacas (comprimento de onda 450 ou 450/620 nm, com uma linearidade até DO >= 2000)
- Lavagem de microplacas (preferível) capaz de fornecer volumes entre 225-375 µl
- Água destilada ou desionizada
- Recipientes de vidro normais para laboratório: cilindros, tubos de teste etc.
- Micropipetas para colheita adequada de solução 10, 100, 1000 µl
- Luvas descartáveis
- Temporizador
- Solução de hipoclorito de sódio (5%)
- Recipientes para colheita de materiais potencialmente infecciosos
- Lenço absorvente

#### 5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DE REAGENTES

Os reagentes devem ser mantidos a 2/8°C.

A data de validade está impressa em cada componente e na etiqueta da embalagem

#### Os reagentes têm uma estabilidade limitada após abertura e/ou preparação

| REAGENTE                | CONDIÇÕES                                                                   |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Microplaca              | 5 semanas a 2/8°C, saco de polietileno                                      |
| Soros de controlo       | 5 semanas a 2/8°C                                                           |
| Conjugado               | 5 semanas a 2/8°C                                                           |
| Antigénio reconstituído | deve ser usado no mesmo dia, não pode ser congelado                         |
| Substrato               | até à data de validade a 2/8°C, 1 semana a 15-30°C, guarde ao abrigo da luz |
| Diluyente de amostras   | até à data de validade a 2/8°C                                              |
| Tampão de lavagem       | 2 semanas a 2/8°C, 5 dias a 15/30°C.                                        |
| Solução de paragem      | até à data de validade a 2/8°C                                              |

#### 6. PRECAUÇÕES

## PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO APENAS.

### Cuidado!

Este kit contém materiais de origem humana que foram examinados e deram uma resposta negativa por métodos aprovados pela FDA à presença de HbsAg e de anticorpos anti-HIV1, anti-HIV2 e anti-HVC. Dado que nenhum teste de diagnóstico poderá dar uma leitura completa no que respeita a agentes infecciosos, todo o material de origem humana deve ser manuseado como potencialmente infeccioso. Todas as precauções normalmente adoptadas na prática de laboratório devem ser seguidas quando manusear material de origem humana.

**Eliminação de resíduos:** as amostras de soro e os reagentes utilizadas devem ser tratados como resíduos infecciosos e portanto, eliminados em conformidade com as disposições legais aplicáveis.

### Informação de saúde e segurança

1. Não utilize a boca na pipetagem. Utilize luvas descartáveis e protecção para os olhos quando manusear amostras e executar o ensaio. Lave as mãos meticulosamente quando tiver acabado.
2. Os seguintes reagentes contêm baixas concentrações de substâncias nocivas ou irritantes.
  - a) O tampão para enxaguar contém detergentes
  - b) O conjugado contém fenol
  - c) O substrato é ácido
  - d) Os controlos contêm azida de sódio a 0.9% que pode reagir com chumbo e cobre nos canos e formar depósitos altamente explosivos de azidas metálicas.

Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou olhos, lave a área profusamente com água.
3. Aparelhos não descartáveis devem ser esterilizados após a utilização. O método preferido é a autoclave para 1 hora a 121°C; os descartáveis devem ser colocados em autoclave ou incinerados.
4. O ácido sulfúrico necessário para a solução de paragem e ácido hidróclórico usado na lavagem de recipientes de vidros são corrosivos e devem ser manuseados com atenção apropriada. Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou olhos, lave a área profusamente com água.
5. Ácidos neutralizados e outros líquidos dispensáveis devem ser descontaminados juntando um volume suficiente de hipoclorito de sódio para obter uma concentração final de pelo menos 1.0%. Uma exposição de 30 minutos a hipoclorito de sódio a 1% pode ser necessária para assegurar uma descontaminação efectiva.
6. Salpicos de materiais potencialmente infecciosos devem ser removidos imediatamente com lenço de papel absorvente e a área contaminada esfregada com hipoclorito de sódio a 1.0%, por exemplo, antes de o trabalho continuar. O hipoclorito de sódio não deve ser usado com salpicos que contenham ácidos, excepto se a área salpicada for primeiro seca. Os materiais usados para limpar salpicos, incluindo as luvas, devem ser descartados como lixo biológico potencialmente perigoso. Não coloque em autoclave materiais que contenham hipoclorito de sódio.

### Precauções analíticas

1. Aguarde que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (18-30°C) antes da utilização. Reponha imediatamente os reagentes à temperatura recomendada para armazenamento após utilização. **É importante trabalhar à temperatura correcta. Verifique se o termostato não desce abaixo de 35°C ou acima de 39°C.** Abra o envelope que contém as tiras após cerca de 30 minutos à temperatura ambiente, no mínimo.
2. Não utilize reagentes além da data de validade anunciada. Contaminação microbiológica de reagentes deve ser evitada, dado que poderá reduzir a duração do produto e provocar resultados errados.
3. Não modifique o procedimento de teste ou substitua reagentes por outros de outros fabricantes ou outros lotes de reagente a menos que sejam estipulados como intermutáveis. Não reduza nenhum dos tempos recomendados para incubação.
4. Qualquer recipiente de vidro a ser usado com os reagentes deve ser lavado profusamente com ácido hidróclórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada de alta qualidade.
5. Não exponha reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.
6. Não deixe que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.
7. Deve-se ter cuidado para não haver contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com os vários reagentes.
8. Deve ser tomado cuidado para evitar tocar ou salpicar a borda do poço com o conjugado. Não “assopre” as microplacas.
9. Os ensaios de imuno-enzimas podem exibir ocasionalmente um "efeito de margem" que deve ser minimizado aumentando a humidade durante os passos de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas a 37°C tanto num banho de água com suporte flutuante ou para rack para suportar as placas se for necessário, ou num incubador. Alternativamente, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Veja o manual de instruções apropriado para mais detalhes. Os incubadores de CO<sub>2</sub> não devem ser utilizados.

10. Assegure-se que a parte inferior da placa está limpa e seca, e que nenhuma bolha está presente na superfície do líquido antes de a ler.
11. A utilização de amostras altamente hemolizadas, soros incompletamente coagulados, ou amostras com contaminação microbiana pode dar resultados erróneos.
12. Uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado por o usuário.
13. Para cada instrumento utilizado, leia o manual de instruções do fabricante cuidadosamente para obter informação adicional sobre os seguintes pontos:
  - instalação e requisitos particulares
  - princípios de operação, instruções, precauções e riscos
  - especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
  - manutenção e reparação

## **7. TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS**

A amostra é composta de soro recolhido de maneira normal numa veia e manuseado com todas as precauções por boas práticas laboratoriais. O soro fresco pode ser guardado durante 4 dias a 2/8°C, ou congelado por períodos mais longos a -20°C, e pode ser descongelado um máximo de três vezes. Evite a utilização de congeladores autodescongeláveis para armazenamento de amostras.

Amostras descongeladas devem ser cuidadosamente batidas antes de efectuar o teste. Inactivação de calor pode levar a resultados erróneos. A qualidade da amostra pode ser seriamente afectada por contaminação microbiana que leve a resultados erróneos.

Amostras fortemente lipémicas, contaminadas ou ictericas devem ser evitadas.

**O teste não pode ser executado em plasma humano.**

## **8. PROCEDIMENTO DE TESTE**

### **Técnica manual**

- Prepare a quantidade necessária de tiras
- Prepare o tampão de lavagem diluindo o tampão de lavagem 10x (100 mL + 900 mL H<sub>2</sub>O).
- Prepare o antigénio reconstituindo o produto seco e congelado com o conjugado (volume relatado na etiqueta).

Amostras diluídas 1:101 distribuindo 10 µL de soro em 1mL de diluente. Deixe um poço para a nula, executando com a utilização de 100 µL de mistura de substrato. Coloque 100 µL de cada amostra diluída por poço (testes duplicados são recomendados). Coloque calibradores NÃO DILUÍDOS numa tira (100 µL em cada poço). O requisito mínimo é 1 controlo negativo, 2 de corte e um positivo.

Os poços são cobertos com filme protector e incubados durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar quatro vezes durante 30 segundos (300 µL), junte 100 µL de imunocomplexo (Antigénio/ anticorpos monoclonais anti-HSV marcados com HRP) a cada poço e deixe incubar mais uma vez durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com filme protector. A placa é lavada mais quatro vezes, como está descrito acima. Finalmente, o substrato é distribuído, 100 µL/poço.

Após 15 minutos à temperatura ambiente, a reacção enzimática é parada com 100 µL de solução de paragem.

A adsorância (D.O. é lida a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min.

|                                            |
|--------------------------------------------|
| <b>9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE</b> |
|--------------------------------------------|

### **Técnica manual**

**PASSO 1** Coloque 100 µL de amostra diluída//controlos nos poços das tiras.

- Incube durante 45 minutos a 37°C
- Lave quatro vezes. (300 µL)

**PASSO 2** Junte 100 µL de imunocomplexo a cada poço

- Incube durante 45 minutos a 37°C
- Lave quatro vezes. (300 µL)

**PASSO 3** Junte 100 µL de substrato a cada poço

- Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente

PASSO 4 Adicione 100 µL de solução de paragem.

Leia a adsorção a 450 nm dentro de 30 min.

#### **10. VALIDAÇÃO DO TESTE**

Subtraia o valor do nulo ( $\leq 0.150$ ) de todas as outras leituras. Os valores D.O. do soro de controlo de corte quando forem testados em triplicado devem estar dentro do valor médio de 25%. Ignore qualquer valor anormal e recalcule o médio. O controlo positivo deve ter uma D.O. de pelo menos 1.5 vezes a do soro de corte. A relação entre Controlo Negativo e de Corte deve ser  $\leq 0.6$ . O valor de D.O. do directo deve ser  $\geq 0.2$  a 450 nm e  $\geq 0.16$  a 450/620 nm.

#### **11. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

##### **Resultados qualitativos**

Se a adsorção da amostra for maior que a de corte, a amostra é positiva para a presença de IgM específico.

Calcule a relação entre o valor DO da amostra e a do valor de corte (ÍNDICE). A amostra é considerada:

Positiva: se a relação for  $> 1.2$ .

Duvidosa:  $\pm 20\%$  do valor de corte.

Negativa: se a relação for  $< 0.8$ .

se o resultado for duvidoso, repita o teste. Se permanecer duvidoso, recolha uma nova amostra de soro.

#### **12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**

Tal como acontece com outros testes serológicos, os resultados obtidos servem apenas como um auxiliar de diagnóstico e deve ser sempre interpretado em conjunto com outros resultados.

Espécimes emparelhados são necessários para determinar a seroconversão. Colha o primeiro espécime assim que possível após surgirem os sintomas, e o segundo espécime 2-3 semanas depois. A seroconversão pode não ser detectada se a primeira amostra for recolhida muito tarde durante a infecção. Volte a fazer o ensaio se os resultados obtidos para as amostras emparelhadas forem inconclusivos. Os resultados devem ser interpretados sempre com a avaliação da imagem clínica e os resultados de outras investigações de diagnóstico.

#### **13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA**

Foram testadas 67 amostras de soro contendo substâncias potencialmente interferentes:

- Anticorpos nuclear antinucleares (ANA) (n=12)
- Factor reumatóide (n=8)
- Anticorpos heterófilos (n=5)
- Bilirrubina (n=9)
- Triglicéridos (n=10).
- Citomegalovírus IgM (n=23)

Nenhuma interferência foi notada em qualquer caso.

#### **14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO**

Num ensaio clínico executado num laboratório de hospital, 313 amostras foram analisadas com o kit Diesse comparando com outro método comercial. Todas as amostras discordantes foram analisadas por um terceiro método comercial. Os resultados são indicados na tabela seguinte:

|        |   | MÉTODO DE REFERÊNCIA |     |
|--------|---|----------------------|-----|
|        |   | +                    | -   |
| DIESSE | + | 43                   | 6   |
|        | - | 2                    | 262 |

O kit Enzywell tem uma sensibilidade de 95.6% e uma especificidade de 97.8%.

#### **15. PRECISÃO**

**Precisão no teste**

| Amostra         | HSM 1<br>(Negativo<Directo) | HSM 2<br>Positivo>Directo | HSM 3<br>(Positivo) | Directo | Controlo<br>Positivo |
|-----------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------|---------|----------------------|
| n (replicações) | 23                          | 24                        | 24                  | 12      | 12                   |
| D.O.            | 0.202                       | 0.643                     | 0.816               | 0.638   | 1.404                |
| CV%             | 23%                         | 14%                       | 8%                  | 15%     | 6%                   |

**Precisão entre testes**

|            | CONTEÚDO |     |
|------------|----------|-----|
|            | Med.     | CV% |
| Cont. Pos. | 5.8      | 6   |
| HSM1       | 0.4      | 14  |
| HSM2       | 1.2      | 13  |
| HSM3       | 2.0      | 11  |

**Precisão entre lotes**

| Amostra | INDEX      |            |            | Média | CV% |
|---------|------------|------------|------------|-------|-----|
|         | Lot n. 128 | Lot n. 129 | Lot n. 130 |       |     |
| HSM1    | 0.4        | 0.4        | 0.3        | 0.4   | 16  |
| HSM2    | 1.3        | 1.3        | 1.1        | 1.2   | 9   |
| HSM3    | 2.2        | 1.9        | 1.7        | 1.9   | 13  |

**16. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS**

| PROBLEMA                            | POSSÍVEIS CAUSAS                                                            | TESTE OU ACÇÃO                                                                                                                       |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Passagem inválida (todos negativos) | Um ou mais reagentes não foram adicionados ou estão na sequência incorrecta | Verifique o procedimento<br>Verifique se existem soluções não usadas.<br>Repita o teste                                              |
|                                     | Placa não reactiva                                                          | Verifique o código na embalagem que contém a placa (ver o código correcto no anexo da embalagem).                                    |
|                                     |                                                                             | Verifique a existência de humidade na placa não utilizada. (O dissecante de gel de sílica deve estar amarelo pálido). Repita o teste |
| Passagem inválida (todos positivos) | Contaminação do substrato                                                   | Obtenha nova aliquota de substrato.                                                                                                  |
|                                     | Lavagem inadequada                                                          | Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem                                                                                   |
| Pouca precisão                      | Lavagem incompleta dos poços                                                | Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem                                                                                   |
|                                     | Aspiração inadequada de poços                                               | Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem                                                                                   |
|                                     | Erro de pipetagem                                                           | Verifique a função de pipetagem                                                                                                      |
|                                     | A adição de reagente é muito lenta                                          | Evite a secagem da placa após o passo de lavagem. Adicione os reagentes imediatamente                                                |
|                                     | Presença de bolhas                                                          | Evite bolhas de ar durante a pipetagem.                                                                                              |
|                                     | A passagem óptica não está limpa                                            | Verifique se o instrumento luminoso e o detector têm sujidade. Limpe a parte inferior da placa com um pano suave.                    |
| Desenvolvimento inadequado de cor.  | Tempos ou temperatura de incubação inadequados                              | Verifique o controlo de temperatura e a monitorização do tempo.                                                                      |
|                                     |                                                                             | Observe as instruções recomendadas de utilização.                                                                                    |
|                                     | Volume inadequado do substrato adicionado à placa                           | Verifique a função de pipetagem                                                                                                      |

**17. REFERÊNCIAS**

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. S. Land et al.: Rapid diagnosis of herpes simplex virus infections by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 19: 865 (1984).
3. B. Gonik et al.: Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 29: 436 (1991).
4. C. Gleaves et al.: Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of herpes simplex virus (HSV) antigen from clinical specimens in viral transport media. J. Virological Meth. 28: 133 (1990).
5. M. Morgan and T. Smith: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 19: 730 (1984).
6. D. Ho et al.: Indirect ELISA for the detection of HSV-2 specific IgG and IgM antibodies with glycoprotein G (gG-2). J. Virological Meth. 36: 249 (1992).
7. R. Eberle et al.: The immune response to herpes simplex virus: comparison of the specificity and relative titers of serum antibodies directed against viral polypeptides following primary herpes simplex virus type 1 infections. J. Med. Virology 16: 1247 (1985).
8. J.E. Kuhn et al.: Analysis of the IgM and IgG antibody response against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) structural and nonstructural proteins. J. Medical Virology 23: 135 (1987).

|                                                                                     |                |                                                                                                                               |                |                                                                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | EN<br>ES<br>IT | Date of manufacture<br>Fecha de fabricación<br>Data di fabbricazione                                                          | FR<br>GR<br>PT | Date de fabrication<br>Ημερομηνία Παραγωγής<br>Data de fabrico                                                                            |
|    | EN<br>ES<br>IT | Use By<br>Fecha de caducidad<br>Utilizzare entro                                                                              | FR<br>GR<br>PT | Utiliser jusqu'e<br>Ημερομηνία λήξης<br>Prazo de validade                                                                                 |
|    | EN<br>ES<br>IT | Caution, consult accompanying documents<br>Atención, ver instrucciones de uso<br>Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso   | FR<br>GR<br>PT | Attention voir notice d'instructions<br>Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα<br>Atenção, consulte a documentação incluída       |
|    | EN<br>ES<br>IT | Manufacturer<br>Fabricante<br>Fabbicante                                                                                      | FR<br>GR<br>PT | Fabricant<br>Κατασκευαστής<br>Fabricante                                                                                                  |
|    | EN<br>ES<br>IT | Contains sufficient for <n> tests<br>Contenido suficiente para <n> ensayos<br>Contenuto sufficiente per "n" saggi             | FR<br>GR<br>PT | Contenu suffisant pour "n" tests<br>Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις<br>Conteúdo suficiente para “n” ensaios                         |
|    | EN<br>ES<br>IT | Temperature limitation<br>Límite de temperatura<br>Limiti di temperatura                                                      | FR<br>GR<br>PT | Limites de température<br>Περιορισμοί θερμοκρασίας<br>Limites de temperatura                                                              |
|    | EN<br>ES<br>IT | Consult Instructions for Use<br>Consulte las instrucciones de uso<br>Consultare le istruzioni per l'uso                       | FR<br>GR<br>PT | Consulter les instructions d'utilisation<br>Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης<br>Consulte as instruções de utilização                     |
|    | EN<br>ES<br>IT | Biological risks<br>Riesgo biológico<br>Rischio biologico                                                                     | FR<br>GR<br>PT | Risques biologiques<br>Βιολογικοί κίνδυνοι<br>Risco biológico                                                                             |
|    | EN<br>ES<br>IT | Catalogue number<br>Número de catálogo<br>Numero di catalogo                                                                  | FR<br>GR<br>PT | Référence du catalogue<br>Αριθμός καταλόγου<br>Referência de catálogo                                                                     |
|  | EN<br>ES<br>IT | In Vitro Diagnostic Medical Device<br>Producto sanitario para diagnóstico in vitro<br>Dispositivo medico-diagnostico in vitro | FR<br>GR<br>PT | Dispositif médical de diagnostic in vitro<br>In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν<br>Dispositivo médico para diagnóstico in vitro |
|  | EN<br>ES<br>IT | Batch code<br>Código de lote<br>Codice del lotto                                                                              | FR<br>GR<br>PT | Code du lot<br>Αριθμός Παρτίδας<br>Código do lote                                                                                         |



**DIESSE Diagnostica Senese**  
**Strada dei Laghi 39**  
**53035 Monteriggioni (Siena) Italy**  
**Tel. 0577-587111**