



ENZYWELL

HERPES SIMPLEX 1+2 IgG

REF 91020 (96 tests)

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



INDICE / INDEX / INDICE / CONTEÚDO

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 / ΕΓΚΥΠΟΤΗΤΑ 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 IgG

REF 91020

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgG ANTI HERPES SIMPLEX VIRUS (TIPO 1 E 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 è basato sul principio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).

L'antigene, costituito da Herpes Virus tipo 1 e 2 purificato ed inattivato, viene legato alla fase solida (strip di pozzetti 1x8). Per incubazione con siero umano diluito le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene.

Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti IgG umane marcati con perossidasi.

Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi.

Il colore che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame.

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. 12 x 8 pozzetti sensibilizzate con herpes simplex virus (colorate in viola)

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta al codice (H, 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 1 x 1.6 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi anti-HSV IgG, in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente 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 1 x 2 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi anti-HSV IgG, in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONJ CONIUGATO 1 x 16 mL

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti IgG umane marcati con perossidasi, in tampone fosfato con fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

CONTROL IgG - IgG CONTROLLO NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Siero umano diluito 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 Pronto all'uso **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H₂O₂ 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

Stabilità: Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato a 2/8°C.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H₂SO₄ 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 or 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	6 settimane 2/8°C busta di polietilene
CONTROLLI	6 settimane 2/8°C
CONIUGATO	6 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

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 calibratori contengono come conservante 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. Evitare l'uso di congelatori autosbrinatori per la conservazione dei campioni.
6. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
7. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
8. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
9. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
10. 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 CO₂.
11. 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.
12. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
13. L'uso del kit con strumento automatici deve essere validato dall'utilizzatore.

14. 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 campioni 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 H₂O).

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 del coniugato 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 450/620 nm entro 30 min.

9. SCHEMA DEL SAGGIO

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 coniugato 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 Stop Solution |
| | - |
| | Leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min. |

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Togliere il valore del bianco (≤ 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 ≤ 0.6 . La O.D. del cut-off $\geq 0,2$ 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 IgG 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

Sieri prelevati durante la fase acuta dell'infezione, quando sono presenti solamente anticorpi della classe IgM, potrebbero risultare negativi con questa tecnica.

Il livello delle IgM anti-Herpes Simplex Virus dovrebbe essere determinato usando il kit Enzywell Herpes Simplex Virus IgM. Alternativamente, si analizzerà un secondo campione prelevato 8-14 giorni più tardi, per verificare se vi sia stato un aumento delle IgG.

Il risultato del test deve essere comunque valutato insieme a dati provenienti da altre indagini diagnostiche.

13. SPECIFICITÀ ANALITICA

Sono stati testati 17 campioni negativi all'Herpes Simplex, contenenti anticorpi IgG contro virus quali quello della Rubella, Epstein Barr, Citomegalovirus, Parotite. In nessun caso la presenza di tali anticorpi influenzava il test.

14. SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA

In una sperimentazione clinica eseguita in un laboratorio ospedaliero, sono stati analizzati 348 campioni, di cui 61 risultavano negativi e 287 positivi. I campioni sono stati analizzati con un altro metodo immunoenzimatico commerciale: si è trovato un accordo del 100% fra i due metodi.

Il kit Enzywell ha sensibilità e specificità del 100%.

15. PRECISIONE

Precisione all'interno della seduta

<i>Cut Off n=15</i>	<i>Lotto N. 084</i>	<i>Lotto N. 085</i>	<i>Lotto N. 086</i>
D.O.	0.446	0.388	0.598
CV%	6	10	6

Precisione tra sedute

	INDEX						
Campione	I run	II run	III run	IV Run	V Run	Media	CV%
HSG 1	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4	12
HSG 2	1.9	2.4	2.2	2.0	1.7	2.0	13
HSG 3	3.7	4.9	5.5	4.7	3.4	4.4	20
Controllo Pos.	6.3	6.7	7.9	8.0	5.8	6.9	14

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. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. 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 inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

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 IgG

REF 91020

(English)

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC KIT FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgG-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 is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay) (1-8).

The antigen, composed of purified and inactivated Herpes Virus types 1 and 2, is bound to the solid phase (8-well strips). The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum.

After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of human IgG monoclonal antibodies labelled with peroxidase. The unbound conjugate is eliminated and the peroxidase substrate is added.

The colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample.

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 herpes simplex virus (coloured in violet).

Use: open the package at the opposite end from the code (H 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, at known concentration of anti-HSV IgG, in Phosphate buffer 0.01 mol/L containing 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 mL

Contents: Diluted human serum, at known concentration of anti-HSV IgG, in Phosphate buffer 0.01 mol/L containing BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

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

CONJ CONJUGATE 1x16 mL

Contents: monoclonal antibodies labelled with Peroxidase, in phosphate buffer solution containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%. Ready for use without further dilution.

CONTROL IgG - IgG NEGATIVE CONTROL (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

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

Stability: The product is stable up to the expiry date when stored unopened at 2/8°C.

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) 1x12 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).

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

H₂SO₄ 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Incubator at 37-40°C
- Microplate reader, wavelength 450 or 450/620 nm, with OD linearity up to 2,000 (at least).
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µl
- Distilled or deionized 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	6 weeks at 2/8°C, polythene bag
Controls	6 weeks at 2/8°C
Conjugate	6 weeks at 2/8°C
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.

Attention:

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) Calibrators contain Sodium Azide 0.09% as preservative which may react with copper and lead in plumbing to form potentially explosive 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. CO₂ 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 mixed 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 H₂O).

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 conjugate 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 450/620 nm within 30 min.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

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 conjugate 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 (≤ 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 ≤ 0.6 . The OD of the cut off must be > 0.2 at 450 nm and ≥ 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 IgG. 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

A serum sample obtained during the acute phase of infection, when only IgM antibodies are present, may be negative by this procedure.

The Herpes Simplex Virus IgM level should be determined using Enzywell Herpes IgM kit. Alternatively, a second serum sample obtained 8-14 days later, should be tested in parallel to determine an increase in the IgG antibody level.

The test result should be used in conjunction with information available from the evaluation of other diagnostic procedures.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

17 samples which were negative for Herpes Simplex, but which contained IgG antibodies against other viruses such as Rubella, Epstein Barr, Cytomegalovirus or Mumps, were tested. None of these antibodies influenced the test.

14. SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In a clinical trial performed in a hospital laboratory, 348 samples were analysed, 61 of which proved negative and 287 positive. The samples were analysed with another commercial immunoenzymatic method: 100% agreement was found between the two methods.

The Enzywell kit offers 100% sensitivity and specificity.

15. PRECISION

In-run Precision

<i>Cut Off</i> $n=15$	<i>Lot N. 084</i>	<i>Lot N. 085</i>	<i>Lot N. 086</i>
O.D.	0.446	0.388	0.598
CV%	6	10	6

Between-run Precision

	INDEX						
Sample	I run	II run	III run	IV Run	V Run	Average	CV%
HSG 1	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4	12
HSG 2	1.9	2.4	2.2	2.0	1.7	2.0	13
HSG 3	3.7	4.9	5.5	4.7	3.4	4.4	20
Pos. Control	6.3	6.7	7.9	8.0	5.8	6.9	14

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 Check for unused solutions. Repeat test.
	Unreactive plate	Check the code on the package containing the plate (see package insert point 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. 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).
- 2S. 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).



GEBRAUCHSANWEISUNG
ENZYWELL
HERPES SIMPLEX 1+2 IgG

REF 91020

(Deutsch)

1. VERWENDUNGSZWECK

ELISA-ASSAY ZUR QUALITATIVEN BESTIMMUNG VON IGG-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 ELISA-Technik (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (1-8).

Das Antigen, das aus gereinigtem und inaktiviertem Herpes-Virus Typ 1 und 2 besteht, ist an eine Festphase (Streifen mit je 8 Wells) gebunden. Die spezifischen Immunglobuline werden bei der Inkubation mit verdünntem Patientenserum an das Antigen gebunden.

Die ungebundenen Proteine, die nicht reagiert haben, werden aus den Wells gewaschen; danach folgt eine Inkubation mit dem Konjugat aus monoklonalen Antikörpern gegen humanes IgG, die mit Peroxidase gekoppelt sind. Das ungebundene Konjugat wird entfernt und das Peroxidase-Substrat zugegeben.

Die Farbe, die sich entwickelt, ist proportional zur Konzentration von spezifischen Antikörpern, die in der Probe vorhanden sind.

4. KITKOMPONENTEN

Die Reagenzien sind ausreichend für 96 Bestimmungen.

Vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

MT PLATE MIKROTITERPLATTE 12x8 Wells, beschichtet mit Herpes-simplex-Virus (violett gefärbt).

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

CONJ KONJUGAT 1x16 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 mit bekannter Anti-HSV-IgG-Konzentration in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 1 % BSA und 0,09 % Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

Farbe: Die Farbe der Kontrolle ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

CONTROL CUT-OFF CUT-OFF KONTROLLSERUM 1 x 2,0 mL

Inhalt: Verdünntes Humanserum mit bekannter Anti-HSV-IgG-Konzentration in 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 1 % BSA und 0,09 % Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

Farbe: Die Farbe der Kontrolle ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

CONTROL IgG - IgG 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**

(PF93619) 12 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.

H₂SO₄ 0.3 M STOPPLÖSUNG (PF93602) 1 x 1,6 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: H₂SO₄ 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	6 Wochen bei 2-8 °C im Polyethylenbeutel
KONTROLLSERUM	6 Wochen bei 2-8 °C
KONJUGAT	6 Wochen 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:
 - d) Der Waschpuffer enthält Detergenzien.
 - e) Das Konjugat enthält Phenol.
 - f) Das Substrat ist eine Säure.
 - g) 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 Flüssigkeitsabfall sollten mit einer ausreichenden Menge von Natriumhypochlorid mit einer Endkonzentration von mindestens 1,0 % dekontaminiert werden. Eine 30-minütige Behandlung mit Natriumhypochlorid (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 CO₂ 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 H₂O).

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 Konjugat in die 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 innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm / 620 nm / 405 nm messen.

9. TESTSCHEMA

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> A. 100 µl der verdünnten Probe, Kalibratoren und B. Kontrollen in die entsprechenden Wells pipettieren. C. 45 Min. bei 37 °C inkubieren. D. 4-mal waschen (300 ± 75 µl). E. 100 µl Konjugat in alle Wells pipettieren. F. 45 Min. bei 37 °C inkubieren. G. 4-mal waschen (300 ± 75 µl). H. 100 µl Substrat in alle Wells pipettieren. I. 15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren. J. 100 µl Stopplösung hinzufügen. |
|--|

K. 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 $> 0,2$ 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 IgG-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: ± 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

Eine Serumprobe, die in der akuten Phase einer Infektion entnommen wurde, wenn nur IgM-Antikörper vorhanden sind, kann in diesem Test negativ ausfallen.

Die Herpes-simplex-Virus-IgM-Werte sollten mit dem Herpes IgM Kit bestimmt werden. Alternativ können Sie auch nach 8-14 Tagen erneut IgG bestimmen, um einen Anstieg zu überprüfen.

Zur Erstellung der Diagnose sollte das Testergebnis immer nur in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Informationen verwendet werden.

13. ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

Es wurden 17 Proben getestet, die negativ für Herpes simplex waren, jedoch IgG-Antikörper gegen andere Viren wie z. B. Rubella, Epstein Barr, Cytomegalovirus oder Mumps enthielten. Keiner dieser Antikörper beeinflusste den Test.

14. RELATIVE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

In einer klinischen Studie wurden 348 Proben getestet, von denen 61 negativ und 287 positiv waren. Die Proben wurden mit einer anderen kommerziellen immunenzymatischen Methode getestet: Die beiden Methoden stimmten zu 100 % überein.

Der Kit bietet 100 % Sensitivität und Spezifität.

15. PRÄZISION

Die Intraassay-Präzision wurde mit drei verschiedenen Lots ermittelt.

Präzision in der Serie, ermittelt mit drei verschiedenen Lots

Cut-Off n=21	Lotnr.104	Lotnr. 105	Lotnr. 106
O.D.	0,453	0,374	0,433
CV%	4,62	4,73	4,07

„Interassay“- und „Lot-zu-Lot“-Präzision

	EU/ml			
Probe	I. Serie	II. Serie	III. Serie	CV%
n.1	12,6	17,5	17,6	18
n.2	78,5	87,5	96,3	10

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 (alle negativ)	Eins oder mehrere Reagenzien wurden nicht zugefügt oder in der falschen Reihenfolge.	Überprüfen Sie die Testdurchführung. Suchen Sie nach evt. ungenutzten Reagenzien. 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.) Wiederholen Sie den Test.
Ungültiger Testrun (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 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. : 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 IgG ΑΠΛΟΥ ΕΡΠΗΤΑ 1+2

REF 91020

(Ελληνικά)

1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ IgG 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 βασίζεται στην μέθοδο ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).

Το αντιγόνο, αποτελούμενο από ιό του Έρπητα του τύπου 1 και 2 κεκαθαρισμένο και αδρανοποιημένο, συνδέεται με τη στερεά φάση (ταινία κυψελίδων 1x8). Μέσω επώασης με αραιωμένο ανθρώπινο ορό, οι ειδικές ανοσοσφαιρίνες συνδέονται με το αντιγόνο.

Μετά από εκπλύσεις για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν αντέδρασαν, γίνεται η επώαση με το συζυγές, που αποτελείται από ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι IgG σεσημασμένα με υπεροξειδάση.

Απομακρύνεται το συζυγές που δεν αντέδρασε και προστίθεται το ειδικό υπόστρωμα για την υπεροξειδάση.

Το χρώμα που σχηματίζεται είναι ανάλογο προς την συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων που βρίσκονται στον υπό εξέταση ορό.

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 12 x 8 κυψελίδες ευαισθητοποιημένες με ιό απλού έρπητα (χρώματος μοβ).

Χρήση: Ανοίξτε το περίβλημα των ταινιών από την αντίθετη πλευρά που αναγράφεται ο κωδικός (Η 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 1 x 1.6 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός με γνωστή συγκέντρωση αντισωμάτων IgG 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 1 x 2 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός με γνωστή συγκέντρωση αντισωμάτων IgG 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.

CONJ ΣΥΖΥΓΤΕΣ 1 x 16 mL

Περιεχόμενο: διάλυμα μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-IgG σεσημασμένων με υπεροξειδάση, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη 0,05% και Bronidox 0,02%. Έτοιμο για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

CONTROL IgG - ΟΠΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ IgG (PF93910) 1 x 1.6 mL **ΚΟΙΝΟΣ 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 **ΚΟΙΝΟΣ 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 Έτοιμο για χρήση **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Περιεχόμενο: Τετραμεθυλβενζιδίνη 0,26 mg/mL και H₂O₂ 0,01% σταθεροποιημένα σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 mol/L (pH 3,8).

Σταθερότητα: Το προϊόν παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία της λήξης του, αν διατηρηθεί στους 2/8°C.

H₂SO₄ 0.3 M ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (PF93602) 1 x 16 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Διάλυμα H₂SO₄ 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. >= 2,000)
- Συσκευή έκπλυσης μικροπλακιδίων (μη απαραίτητη) ικανότητας 225-375 μl
- 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 UL 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

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

ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ

6 εβδομάδες στους 2/8°C

ΣΥΖΥΓΕΣ	6 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 αντισώματα 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

- 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.
- Η περιεκτικότητα των παρακάτω αντιδραστηρίων σε βλαβερές ή ερεθιστικές ουσίες, είναι χαμηλή:
 - το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης περιέχει ουσίες καθαρισμού
 - το συζυγές περιέχει φαινόλη
 - το υπόστρωμα είναι όξινο
 - 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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

- 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.
- 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.
- 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.
- Όλος ο υάλινος εξοπλισμός πρέπει να απολυμαίνεται προσεκτικά με υδροχλωρικό οξύ 2M και να ξεπλένεται με αποσταγμένο ή με απιονισμένο νερό.

19. Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε ισχυρό φωτισμό ούτε σε υποχλωριώδεις ατμούς, τόσο κατά την αποθήκευσή τους όσο και κατά την επώασή τους.
20. Οι κυψελίδες δεν πρέπει να ξεραίνονται, κατά την διάρκεια των τεστ.
21. Να αποφεύγετε την διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιείτε πάντοτε τις ειδικές πιπέτες.
22. Μην ακουμπάτε το χείλος της κυψελίδας με το συζυγές. Μην φυσάτε πάνω στα μικροπλακίδια.
23. 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 CO₂.
24. 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.
25. Τα δείγματα που παρουσιάζουν ισχυρή αιμόλυση, οροί με ατελή πήξη, ή δείγματα που παρουσιάζουν μικροβιακή μόλυνση, μπορεί να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα.
26. Η χρήση ενός κιτ με αυτόματες συσκευές, πρέπει να ελεγχθεί και να επικυρωθεί από τον χρήστη.
27. 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 καταψύξετε 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 H₂O)

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 κάθε αραιωμένου δείγματος, ανά κυψελίδα (συνιστάται η εκτέλεση της ανάλυσης 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 συζυγούς σε κάθε κυψελίδα και βάλτε τις και πάλι να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C καλύπτοντάς τις και πάλι 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 τις ταινίας.
-
- Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C
-
- Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 μl)
-

- STEP 2 Ρίξτε 100 μ L συζυγούς ανά κυψελίδα
-
Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C
-
Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 μ L)
-
STEP 3 Ρίξτε 100 μ L Υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα
-
Επωάστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
-
STEP 4 Προσθέστε 100 μ L Stop Solution
-
Διαβάστε την Ο.Π. στα 450 nm μέσα σε 30 λεπτά.

10. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Αφαιρέστε την τιμή του τυφλού (≤ 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 ≤ 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

Όταν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος είναι ανώτερη από εκείνη του Cut-off το δείγμα προκύπτει θετικό λόγω της παρουσίας των ειδικών IgG.

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

Οροί που συλλέχθηκαν κατά την οξεία φάση της λοίμωξης, όταν είναι παρόντα μόνο τα αντισώματα IgM, μπορεί να δώσουν αρνητικά αποτελέσματα με αυτή την τεχνική.

Η τιμή των IgM αντι-Herpes Simplex Virus πρέπει να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας το kit Enzywell Herpes Simplex Virus IgM. Εναλλακτικά θα αναλυθεί ένα δεύτερο δείγμα που θα έχει συλλεχθεί 8-14 ημέρες μετά, για να εξακριβωθεί τυχόν αύξηση των IgG.

Σε κάθε περίπτωση το αποτέλεσμα του τεστ θα πρέπει να συνεκτιμηθεί με άλλα δεδομένα προερχόμενα από άλλες διαγνωστικές έρευνες.

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Αναλύθηκαν 17 δείγματα, αρνητικά ως προς τον Απλό Έρπητα και που περιείχαν αντισώματα IgG εναντίον των ιών της Ερυθράς, του Epstein Barr, του Κυτταρομεγαλοϊού και της Παρωτίτιδας. Η παρουσία αυτών των αντισωμάτων δεν επηρέασε το τεστ σε καμία περίπτωση.

14. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Σε έναν κλινικό πειραματισμό, που έγινε σε ένα νοσοκομειακό εργαστήριο, αναλύθηκαν 348 δείγματα εκ των οποίων 61 προέκυψαν αρνητικά και 287 θετικά. Τα δείγματα αναλύθηκαν και με μία άλλη ανοσοενζυμική μέθοδο του εμπορίου: μεταξύ των δύο μεθόδων υπήρξε συμφωνία 100%.

Το kit Enzywell παρουσιάζει ευαισθησία και ειδικότητα 100%.

15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΟΥ ΚΙΤ ENZYWELL HERPES SIMPLEX VIRUS IgG

Ακρίβεια στο εσωτερικό της ανάλυσης

Cut Off n=15	Παρτίδα N. 084	Παρτίδα N. 085	Παρτίδα N. 086
Ο.Π.	0.446	0.388	0.598

CV%	6	10	6
-----	---	----	---

Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων

	INDEX						
Δείγμα	Ανάλ. I	Ανάλ. II	Ανάλ. III	Ανάλ. IV	Ανάλ. V	Μ. Τιμή	CV%
HSG 1	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4	12
HSG 2	1.9	2.4	2.2	2.0	1.7	2.0	13
HSG 3	3.7	4.9	5.5	4.7	3.4	4.4	20
Θετ. έλεγχος.	6.3	6.7	7.9	8.0	5.8	6.9	14

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 όχρα). 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 IgG

REF 91020

(Español)

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE ANTICUERPOS IgG HERPES SIMPLEX VIRUS (TIPO 1 E 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 el 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 de 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 METODO

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay)

El antígeno, constituido por Herpes Virus tipo 1 e 2 purificado e inactivo, está unido a la fase sólida (tiras con 8 pocillos). Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno.

Después de varios lavados para eliminar las proteínas que no han reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos monoclonales humanos IgG marcados con peroxidasa.

El conjugado que no se ha unido es eliminado y se añade el sustrato peroxidasa.

El color que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.

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 herpes simplex virus (color en violeta)

Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (H, 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 1 x 1.6 mL

Contenido: Suero humano diluido, a concentración conocida de anticuerpos anti- HSV IgG, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA al 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional (Calibrador 0).

Color: el color es proporcional al título de los anticuerpos.

CONTROL CUT-OFF CONTROL CUT-OFF 1 x 2 mL

Suero humano diluido, a concentración conocida de anticuerpos anti- HSV IgG, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA al 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional (Calibrador 0).

Color: el color es proporcional al título de los anticuerpos.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL

Contenido: anticuerpos monoclonales anti IgG marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol al 0.05% y Bronidox al. Listo para su uso sin diluciones adicionales.

CONTROL IgG - IgG CONTROL NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Suero humano sin anticuerpos, diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA al 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, 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 SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Listo para su uso **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y peróxido de hidrógeno al 0.01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Solución de H₂SO₄ 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2).

BOLSA DE PLÁSTICO (1).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

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

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	6 SEMANAS 2/8°C bolso de plástico
CONTROL	6 SEMANAS 2/8°C
CONJUGADO	6 SEMANAS 2/8°C
SUBSTRATO	hasta la 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 a 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 hidrocórico 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 CO₂.
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 H₂O).

Diluir las muestras 1:101 poniendo 10 µL de suero en 1 mL de diluyente. Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla sustrato.

Dispensar 100 µL de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los calibradores SIN DILUIR en una tira (100 µL para cada pocillo). El requisito mínimo es de 1 control negativo, 2 cut-off y 1 positivo. 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 cada ciclo (300 µL). Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo 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 (D.O.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

Leer otra vez a 405 nm si están OD superiores a 2.000.

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST

Método Manual

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

-

-

Incubar 45 min. a 37°C

-

Lavar 4 veces (300 µL).

STEP 2 Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo

-

Incubar 45 min. a 37°C

-

Lavar 4 veces (300 µL).

-

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 absorbancia a 450 nm dentro de 30 min

10. VALIDACIÓN DEL TEST

Restar el valor del blanco (≤ 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 recalculer 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 ≤ 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 IgG específicas para el antígeno.

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

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

Las muestras recogidas durante la fase aguda de la infección, cuando están presentes solamente los anticuerpos IgM, podrían resultar negativas con este procedimiento.

El nivel de las IgM anti-Herpes Simplex Virus tendría que ser determinado usando el kit Enzywell Herpes Simplex Virus IgM. Alternativamente, se analizará una segunda muestra de suero recogida 8-14 días después para determinar un eventual incremento del nivel de anticuerpos IgG.

El resultado de test tendría que ser evaluado conjuntamente con otros resultados procedentes de otros procedimientos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se analizaron 17 muestras negativas al Herpes Simplex, conteniendo anticuerpos IgG contra virus como lo de la Rubella, Epstein Barr, Herpes Simplex, Citomegalovirus, Parotitis. En ningún caso la presencia de estos anticuerpos afectaba el test.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

En una prueba clínica ejecutada en un laboratorio hospitalario, se analizaron 348 muestras, 61 de las cuales fueron negativas y 287 positivas. Las muestras fueron analizadas con otro método inmunoenzimático comercial; se encontró un acuerdo del 100% entre los dos métodos.

El kit Enzywell ofrece el 100% de sensibilidad y especificidad.

15. PRECISIÓN**Precisión intra-ensayo**

Cut Off n=15	Lote N. 084	Lote N. 085	Lote N. 086
D.O.	0.446	0.388	0.598
CV%	6.3	10	6.2

Precisión en series

	INDEX						
Muestra	I serie	II serie	III serie	IV serie	V serie	V. Medio	CV%
HSG 1	0.39	0.49	0.48	0.38	0.44	0.43	12.1
HSG 2	1.94	2.43	2.19	2.04	1.66	2.05	13.8
HSG 3	3.74	4.90	5.52	4.65	3.41	4.44	19.4
Control Pos.	6.26	6.69	7.89	7.95	5.76	6.91	14.1

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 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).
- 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).



PRECAUTIONS D'UTILISATION

ENZYWELL HERPES SIMPLEX 1+2 IgG

REF 91020

(Français)

1. UTILISATION

METHODE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DETERMINATION QUALITATIVE DES ANTICORPS IgG ANTI-HERPES SIMPLEX VIRUS (TYPES 1 ET 2) DANS LE SERUM HUMAIN, EN TANT QU'AIDE AU DIAGNOSTIC D'INFECTION CAUSEE PAR 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 IgG anti-HSV est basé sur le principe ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). L'antigène, constitué par l'Herpes Virus type 1 et 2, purifié et inactif, est lié à la phase solide (puits du strip 1x8). Pendant l'incubation avec le sérum humain dilué, les immunoglobulines spécifiques se lient à l'antigène. Après des lavages permettant d'éliminer les protéines qui ne se sont pas liées, on effectue l'incubation avec le conjugué se constituant d'anticorps monoclonaux anti-IgG humaines marqués à la peroxydase.

Le conjugué qui ne s'est pas lié est éliminé et on ajoute le substrat. La couleur qui apparaît dépend de la concentration en anticorps spécifiques dans le sérum examiné.

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 l'Herpes Simplex Virus (couleur violette)

Utilisation : Découper le sachet du côté opposé au code (H, 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 IgG anti-CMV, 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 des sérums de contrôle dépend de la concentration en anticorps.

CONTROL CUT-OFF CONTROLE SEUIL 1 x 2 mL

Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgG anti-CMV, 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 des sérums de contrôle dépend de la concentration en anticorps.

CONJ CONJUGUE 1 x 16 mL

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

Préparation : Prêt à l'emploi.

CONTROL IgG - CONTROLE NEGATIF IgG (PF93910) 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 (H₂O₂ à 0.01 %) stabilisé dans un tampon citrate (à 0.05 mol/l). pH = 3.8.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUTION D'ARRET (PF93602) 1 x 16 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : H₂SO₄ (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. MODALITES DE 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 apposée sur la confection.

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

REACTIF	CONDITIONS
MICROPLAQUE	6 semaines à 2/8 °C, sachet en polythène
CONTROLES	6 semaines à 2/8 °C.
CONJUGUE	6 semaines à 2/8 °C.
SUBSTRAT	jusqu'à péremption à 2/8 °C, 1 semaine à 15/30 °C, dans l'obscurité.
DILUANT	jusqu'à péremption à 2/8 °C.
TAMPON DE LAVAGE	prêt à l'emploi 2 semaines à 2/8 °C, 5 jours à 15/30 °C
SOLUTION D'ARRET	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 come 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 de solution d'hypochlorure de sodium suffisante 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 descendre ni au-dessous de 35 °C, ni monter au-dessus de 39 °C. Laisser le sachet contenant les barrettes revenir à 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 puit 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 CO₂.
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.

L'échantillon ne peut pas se constituer 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).

Exécution

Diluer les échantillons 1 :101 en versant 10µl 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 dans une barrette les contrôles NON dilués (100 µl/puits). Le numéro minimum indispensable est 1 négatif et positif et 2 cut-off. 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 du conjugué 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.

9. SCHEMA D'ANALYSE

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 Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits.

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.

Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl).

3e ETAPE Mettre 100 µl du conjugué 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 (≤ 0.150).

Calculer les valeurs du contrôle seuil. Aucune valeur ne doit s'écarter de plus de $\pm 25 \%$ de la valeur moyenne (si le test est effectué 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 ≥ 0.2 à 450 nm et ≥ 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 à la présence des IgG spécifiques contre l'HSV.

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

L'échantillon est considéré comme :

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

12. LIMITES DE LA METHODE

Un sérum obtenu pendant la phase aiguë de l'infection, quand seulement les anticorps IgM sont présents, peut être négatif avec cette méthode. Le niveau des IgM anti-Herpes Simplex Virus doit être déterminé en utilisant le kit Enzywell HSV IgM. Autrement, un deuxième échantillon prélevé 8-14 jours plus tard, devrait être contrôlé en parallèle pour déterminer un incrément des anticorps IgG. Les résultats obtenus servent seulement en tant que support pour le diagnostic et ils doivent être interprétés avec d'autres observations.

13. SPECIFICITE ANALYTIQUE

17 échantillons négatifs à la présence des anticorps IgG anti-Herpès, mais qui contenaient des anticorps vers d'autres virus comme Rubéole, Epstein Barr, Cytomégalovirus, Parotidite, ont été testés. L'on n'a trouvé aucune interférence.

14. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES

348 échantillons ont été analysés lors d'une expérimentation clinique effectuée dans un laboratoire hospitalier : 61 ont été négatifs et 287 positifs. Une autre méthode immunoenzymatique était utilisée en guise de méthode de comparaison.

Il y a eu une similitude de 100 % entre les deux méthodes.

Cette méthode présente une sensibilité et une spécificité de 100 %.

15. PRECISION

Précision dans la série

<i>Cut Off</i> n=15	<i>Lot N° 084</i>	<i>Lot N° 085</i>	<i>Lot N° 086</i>
<i>O.D.</i>	0.446	0.388	0.598
<i>CV %</i>	6	10	6

Précision inter-séries

	INDICE						
Echantillon	I run	II run	III run	IV Run	V Run	Moyen	CV %
HSG 1	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4	12
HSG 2	1.9	2.4	2.2	2.0	1.7	2.0	13
HSG 3	3.7	4.9	5.5	4.7	3.4	4.4	20
Contrôle Pos.	6.3	6.7	7.9	8.0	5.8	6.9	14

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. 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 être d'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 IgG
REF 91020

(PORTUGUÊS)

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

KIT MONO-ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE ANTICORPOS DE CLASSE IgG 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 é baseado na técnica ELISA (Ensaio de imuno-absorção enzimática) (1-8)

O antígeno, composto de Vírus de Herpes de tipo 1 e 2 parcialmente purificados e inactivados, liga-se à fase sólida (barras de oito poços). As imunoglobulinas são ligadas ao antígeno por incubação com soro humano diluído.

Após as lavagens para eliminar as proteínas que não reagiram, a incubação é efectuada com conjugado, composto de anticorpos IgG humanos monoclonais marcados com peroxidase. O conjugado desligado é eliminado, e o substrato de peroxidase é adicionado.

A cor que se desenvolve é proporcional à concentração de anticorpos específicos presentes na amostra de soro.

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 vírus de herpes simplex (corados de violeta).

Utilização: abra a embalagem no lado oposto do código (H 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, contendo concentrações conhecidas de anticorpos anti-HSV IgG, 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 mL

Conteúdo: O soro humano, contendo concentrações conhecidas de anticorpos anti-HSV IgG, 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.

CONJ CONJUGADO 1x16 mL

Conteúdo: anticorpos monoclonais marcados com Peroxidase, numa solução tampão fosfatada contendo fenol 0,05% e Bronidox 0.02%. Pronto a ser usado sem mais diluição.

CONTROL IgG - IgG CONTROLO NEGATIVO (PF93910) 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.

Estabilidade: O produto fica estável até à data de validade quando for armazenado fechado a 2/8°C.

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).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602) 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

H₂SO₄ 0.3 mol/L, em solução pronta a ser usada.

PELÍCULAS ADESIVAS (2).

SACO DE POLIETILENO (1).

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Incubador a 37-40°C

- Leitor de microplacas, comprimento de onda 450 ou 450/620 nm, com uma linearidade até DO >= 2000 no mínimo.

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	6 semanas a 2/8°C, saco de polietileno
CONTROLO	6 semanas a 2/8°C
CONJUGADO	6 semanas a 2/8°C
SUBSTRATO	até à data de validade a 2/8°C, 1 semana a 15-30°C, guarde ao abrigo da luz
DILUENTE 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.

Atenção:

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 calibradores contêm azida de sódio a 0.09% como conservante que pode reagir com o cobre ou o chumbo dos canos e formar azidas metálicas potencialmente explosivas.
 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 hidrolórico usado na lavagem de recipientes de vidros são corrosivos e devem ser manuseados com cuidado apropriado. 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 hidrolórico 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 CO₂ não devem ser utilizados.
10. Assegure-se que a parte inferior da placa está limpa e seca, e que nenhuma bolha estão presentes na superfície do líquido antes de a ler.
11. A utilização de amostras altamente hemolisadas, soros incompletamente coagulados, ou amostras com contaminação microbiana pode dar resultados erróneos.
12. O 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 misturadas 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 10x (100 mL + 900 mL H₂O).

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 directos 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 conjugado 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 adsorção (D.O.D). é lida a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE

Técnica manual

- | | |
|---------|--|
| PASSO 1 | Coloque 100 µL de amostra diluída/controles nos poços das tiras. |
| | - |
| | Incube durante 45 minutos a 37°C |
| | - |
| | Lave quatro vezes. (300 µl) |
| | - |
| PASSO 2 | Junte 100 µL de conjugado 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 (≤ 0.150) de todas as outras leituras. Os valores D.O. do soro de controlo directo 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 directo. A relação entre Controlo Negativo e Directo deve ser ≤ 0.6 . O valor de D.O. do directo deve ser ≥ 0.2 a 450 nm e ≥ 0.16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Resultados qualitativos

Se a adsorção da amostra for maior que a directa, a amostra é positiva para a presença de IgG específico. Calcule a relação entre o valor DO da amostra e a do valor directo (ÍNDICE).

A amostra é considerada:

Positiva: se a relação for > 1.2 .

Duvidosa: $\pm 20\%$ do valor directo.

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

Uma amostra de soro obtida durante a fase aguda de infecção, quando apenas anticorpos IgM estão presentes, pode revelar-se negativa por este procedimento.

O nível de vírus de Herpes Simplex IgM deve ser determinado usando o kit Enzywell Herpes IgM. Como alternativa, uma segunda amostra de soro obtida 8-14 dias mais tarde, deve ser tratada em paralelo para determinar um aumento de nível de anticorpos IgG.

O resultado de teste deve ser usado em conjunção com a informação disponível na avaliação de outros procedimentos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

17 amostras que estavam negativas para CMV, mas que continham anticorpos IgG para vírus como os da rubéola, Epstein Barr, Citomegalovírus, e Papeira. Nenhum destes factores provocou interferência no teste.

14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE

Num teste clínico executado num laboratório de hospital, 348 amostras foram analisadas, onde 61 provaram ser negativas e 287 positivas. As amostras foram analisadas por outro método imuno-enzimático comercial: Uma concordância de 100% foi encontrada entre os dois métodos.

O kit Enzywell tem uma sensibilidade e especificidade de 100%.

15. PRECISÃO

Precisão entre passagens:

Valor directo <i>n=15.</i>	Lote N. 084	Lote N. 085	Lote N. 086
D.O.	0.446	0.388	0.598
CV%	6	10	6

Precisão entre passagens:

	CONTEÚDO						
Amostra	I passagem	II passagem	III passagem	IV Passagem	V Passagem	Média	CV%
.	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4	12
HSG 2	1.9	2.4	2.2	2.0	1.7	2.0	13
HSG 3	3.7	4.9	5.5	4.7	3.4	4.4	20
Pos. Controlo	6.3	6.7	7.9	8.0	5.8	6.9	14

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



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