ENZYWELL

HERPES SIMPLEX 2 IgG

REF 91026 (96 tests)

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

CE

INDICE / INDEX / ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / INDICE / SOMMAIRE /CONTEÚDO

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ / INDICACIONES DE USO/ UTILISATION/UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / ΕΙΣΑΓΩΓΗ / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / INTERET CLINIQUE / SUMÁRIO E EXPLICAÇÃA DO TESTE

3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCIPE/ PRINCÍPIOS DO TESTE

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ KIT ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS / CONTEÚDA DO KIT E PREPARAÇÃA DO REAGENTE /

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ/ CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS / ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUTIONS D'UTILISATION / PRECAUÇÕES

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION / TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / PROCEDIMIENTO DEL TEST / PROCEDURE / PROCEDIMENTO DE TESTE /

9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ/ ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / SCHEMA D'ANALYSE/ ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE /

10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDATION DU TEST / VALIDAÇÃA DO TESTE /

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETATION DU TEST / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITES DU TEST/ LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO /

13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ/ ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / SPECIFICITE ANALYTIQUE / ESPECIFICIDADE ANALÍTICA /

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES / ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

15. PRECISIONE / PRECISION / ΑΚΡΙΒΕΙΑ / PRECISIÓN / PRECISION / PRECISÃO

16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING" / ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ /GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUTION DES PROBLEMES / RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHIE / REFERÊNCIAS

ISTRUZIONI PER L'USO

ENZYWELL
HERPES SIMPLEX 2 IgG

REF 91026 **(Italiano)**

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgG ANTI HERPES SIMPLEX VIRUS (TIPO 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 sieroconversione. Il dosaggio delle IgG specifiche è importante per definire lo stato sierologico del paziente.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).
L'antigene, costituito da Herpes Virus tipo 2 purificato ed inattivato, viene legato alla fase solida (strip di pozzetti 1x8). Per incubazione con siero umano diluito in una soluzione contenente HSV-1 (Sorbent 1), 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 i reattivi a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE *MICROPIASTRA 12x8 pozzetti sensibilizzati con Herpes Simplex Virus Tipo 2.*
Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta al codice (H2, seguita 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 2 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 2 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.

SORBENT 1 HSV tipo 1 6 flaconcini liofili
Contenuto: HSV-1 purificato ed inattivato in tampone fosfato contenente lattosio.
Preparazione: ricostituire con il volume di diluente indicato in etichetta, agitando per inversione.

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) 1x 12 mL Pronto all'uso* ***INTERCAMBIABILE FRA LOTTI***
Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H_2O_2 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M *SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL* ***INTERCAMBIABILE FRA LOTTI***
Soluzione di H_2SO_4 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 nm o 450/620 nm, con linearità fino ad OD >= 2,000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi compresi tra 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µl di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.
La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

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

REAGENTE	CONDIZIONI
MICROPIASTRA	5 settimane 2/8°C busta di polietilene
SIERI DI CONTROLLO	5 settimane 2/8°C
CONIUGATO	5 settimane 2/8°C
SORBENT 1	la soluzione non è conservabile e deve essere utilizzata dopo la ricostituzione
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

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

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

Avvertenze per la sicurezza personale

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

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

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**
   Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO_2.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
12. L'uso del kit con strumento automatici deve essere validato dall'utilizzatore.

13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
    - installazione e requisiti particolari
    - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
    - specifiche del produttore e performance dello strumento
    - manutenzione e assistenza tecnica.

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto 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 erronei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erronei.
Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati.
Il test non è applicabile al plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

Tecnica manuale

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Preparare il Sorbent 1 ricostituendo il liofilo con il diluente (volume indicato in etichetta).

Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente. Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato.
Distribuire 30 µL di Sorbent 1 e 100 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato).
In uno strip porre (NON DILUITI) i controlli (100 µL per pozzetto ***senza il Sorbent 1***). 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 di 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 a 450/620 nm entro 30 min.

9. SCHEMA DEL SAGGIO

STEP 1 Distribuire 100 µl di controlli (positivo, negativo e cut off) nei pozzetti dello strip (senza il SORBENT)
-
Distribuire 30 µL di SORBENT 1 e 100 µl di siero diluito nei pozzetti dello strip.
-
Incubare 45 min. a 37°C
-
Lavare 4 volte (300 µL)
-
STEP 2 Mettere 100 µL di coniugato per pozzetto
-
Incubare 45 min. a 37°C
-
Lavare 4 volte (300 µL)
-
STEP 3 Mettere 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

Togliere il valore del bianco (<= 0.150) a tutte le altre letture. I valori in OD 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 OD pari almeno a 1,5 volte il Cut-off. Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere <=0,6. La D.O. del cut-off deve essere >= 0,2 a 450 nm e >= 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 (Index) fra il valore della D.O. del campione in esame e quello del Cut-off. Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è > 1.2.

Dubbio: = ± 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. SPECIFICITA' 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. Campioni contenenti un alto titolo di IgG anti HSV 1 possono interferire nel test.

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione clinica eseguita in un laboratorio ospedaliero, sono stati analizzati 172 campioni, . I campioni sono stati analizzati con un altro metodo immunoenzimatico in commercio ; i risultati sono così riassunti:

		Altro metodo	
		P	N
Diesse	P	18	14
	N	4	136

Sensibilità diagnostica: 81.8% (IC al 95%: 61.5-92.7%)
Specificità diagnostica 90.7% (IC al 95%: 84.9-94.4%)

15 . PRECISIONE

Tab.1 Precisione nella prova

Campione	media D.O. .	CV%
HSG1 (n=24)	0.027	9
HSG2 (n=24)	0.561	8
HSG3 (n=24)	1.063	5
Cut Off (n=16)	0.339	6
C. Pos. (n=16)	1.673	5

Tab.2 Precisione tra prove (n=3)

Index	1	2	3	media	DS	CV%
C Pos	3,08	4,31	4,25	3,9	0,7	18
1	0,32	0,17	0,32	0,3	0,09	33
2	1,65	2,27	2,04	2,0	0,32	16

16. GUIDA AI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBLI 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 informazioni tecniche 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	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. Rawls W.E. et al.: Measurement of antibodies to herpesvirus types 1 and 2 in human sera. J. Immunol. 104: 599 (1970).

INSTRUCTIONS FOR USE

ENZYWELL
HERPES SIMPLEX 2 IgG

REF 91026 **(English)**

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC METHOD FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgG-CLASS ANTIBODIES TO HERPES SIMPLEX VIRUS (TYPE 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 IgG is important to establish the serological state of the patient.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay).
The antigen, composed of purified, inactivated Herpes Virus type 2, is bound to the solid phase (strips of 1x8 wells). Through incubation with human serum diluted in a solution containing HSV-1 (Sorbent 1), the specific immunoglobulins are bound to the antigen.
After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate composed of anti-IgG monoclonal antibodies labelled with peroxidase. The unbound conjugate is eliminated and the peroxidase substrate added. The colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum being tested.

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 type 2
Use: open the package at the opposite end from the code (H2, 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 2 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 of the calibrators 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 2 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 of the calibrators 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.

SORBENT 1. HSV type 1 6 vials of freeze-dried powder.
Contents: purified and inactivated HSV-1 in phosphate buffer containing lactose.
Preparation: reconstitute with the volume of diluent reported on the label, mixing by inversion.

CONTROL *IgG -* IgG NEGATIVE CONTROL (PF93910) 1x1.6 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.

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).

H_2SO_4 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL ***INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS***
H_2SO_4 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).
POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED
- Incubator at 37°C
- Microplate reader, wavelength 450 nm 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	5 weeks at 2/8°C, polythene bag
Control sera	5 weeks at 2/8°C
Conjugate	5 weeks at 2/8°C
Sorbent 1	the solution is not stable and must be used after reconstitution
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.

This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by FDA-approved methods for the presence of HbsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test

can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling material of human origin.

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

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
   a) The Wash Buffer contains detergents
   b) The conjugate contains phenol
   c) The substrate is acid
   d) The controls contain 0.9% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides.

   If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
3. Non-disposable apparatus should be sterilized after use. The preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C; disposables should be autoclaved or incinerated.
4. Sulphuric acid required for the Stop Soution 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 sbould 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 excusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO_2 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 performing 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 is not applicable to human plasma.

8. TEST PROCEDURE

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x.
- Prepare Sorbent 1 by reconstituting with diluent (volume reported on the label).

Dilute samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent. Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture.
Dispense 30 µL of Sorbent 1 and 100 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED controls in a strip (100 µL in each well ***without the Sorbent 1***). 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

STEP 1 Place 100 µL of controls (positive, negative and cut off) in the wells of the strip (without the SORBENT).

-

Place 30 µL of Sorbent 1 and 100 µL of diluted serum in the wells of the strip

-

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. VALIDATION OF THE TEST

Subtract the value of the blank (<= 0.150) from all the other values. The value in OD of the Cut-of control must be within 25% of the average value if tested in triplicate. Discard any abnormal value and recalculate the average. The positive control must have an OD at least 1.5 times that of the Cut-Off. The ratio between Negative and Cut-Off must be <= 0.6. The O.D. of the cut-off must be >= 0.2 at 450 nm and >= 0.16 at 450/620 nm.

11. INTERPRETATION OF TEST

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

Positive: if the ratio is > 1.2.

Doubtful: ± 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 TEST 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 Simplex Virus 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 were tested which were non reactive for Herpes Simplex and contained IgG antibodies against Rubella, Epstein Barr, Cytomegalovirus or Mumps. The presence of these antibodies caused no interference in the test. Samples containing a high titer of anti-HSV-1 IgG can cause interference.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

172 samples were tested in a clinical experimentation conducted in a hospital laboratory, in comparison with another commercial immunoenzymatic method. The results can be summarized as follows:

		Other method	
		P	N
Diesse	P	18	14
	N	4	136

Diagnostic sensitivity : 81.8% (IC at 95%: 61.5 - 92.7%)
Diagnostic Specificity : 90.7% (IC at 95%: 84.9 - 94.4%)

15 . PRECISION

Table 1 "In run" Precision

Sample	media D.O. .	CV%
HSG1 (n=24)	0.027	9
HSG2 (n=24)	0.561	8
HSG3 (n=24)	1.063	5
Cut Off (n=16)	0.339	6
C. Pos. (n=16)	1.673	5

Table 2 "Between run" Precision (n=3)

Index	1	2	3	media	DS	CV%
C Pos	3,08	4,31	4,25	3,9	0,7	18
1	0,32	0,17	0,32	0,3	0,09	33
2	1,65	2,27	2,04	2,0	0,32	16

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. Rawls W.E. et al.: Measurement of antibodies to herpesvirus types 1 and 2 in human sera. J. Immunol. 104: 599 (1970).

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

ENZYWELL
IgG ΑΠΛΟΥ ΕΡΠΗΤΑ 2

REF 91026 **(Ελληνικά)**

1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ IgG ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΑΠΛΟΥ ΕΡΠΗΤΑ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ 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 ελάσσονες 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 IgG είναι σημαντικός για την καθορισμό της ορολογικής κατάστασης του ασθενή.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τεστ βασίζεται στην μέθοδο ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).
Το αντιγόνο, αποτελούμενο από τον ιό του Έρπητα του τύπου 2, κεκαθαρμένο και αδρανοποιημένο, συνδέεται με τη στερεά φάση (ταινία κυψελίδων 1x8). Μέσω επώασης με αραιωμένο ανθρώπινο ορό, σε ένα διάλυμα που περιέχει HSV-1 (Sorbent 1), 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 12x8 κυψελίδες ευαισθητοποιημένες με Herpes Simplex Virus 2.
Χρήση: Ανοίξτε το περίβλημα των ταινιών από την αντίθετη πλευρά που αναγράφεται ο κωδικός (H2 ακολουθούμενα 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 2, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο του νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραίωση.
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 2, σε

φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο του νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραίωση.
Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αντισωμάτων.

CONJ ΣΥΖΥΓΕΣ 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 αραίωση.

SORBENT 1 HSV τύπος 1 6 αμπούλες με κρυο-αφυδατωμένο προϊόν
Περιεχόμενο: HSV-1 κεκαθαρμένος και αδρανοποιημένος σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με γαλακτόζη.
Προετοιμασία: Η ανασύσταση γίνεται με την προσθήκη της ποσότητας του διαλύτη που υποδεικνύεται στην ετικέτα. Ανακατέψτε αναποδογυρίζοντας.

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 αραίωση.

WASH BUF 10x ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ 10Χ (PF93603) 1 x 100 mL ***ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ***
Περιεχόμενο: Ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα (PBS) συμπυκνωμένο 10 φορές, που περιέχει Brij 0.5%.
Προετοιμασία: Αραιώστε τον απαιτούμενο όγκο σε αναλογία 1:10 με αποσταγμένο νερό για να παρασκευάσετε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης έτοιμο για χρήση. Αν σχηματιστούν κρύσταλλοι, διαλύστε τους στους 37°C πριν την αραίωση.

SAMP DIL 2 ΔΙΑΛΥΤΗΣ 2 (PF93611) 1 x 100 mL***ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ***
Χρησιμοποιείται για την αραίωση των δειγμάτων.
Περιεχόμενο: Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) με πρωτεΐνες,, αζίδιο του νατρίου και χρωστική ουσία (πορτοκαλί του μεθυλίου).

SUBS TMB ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (PF93619) 1x 12 mL Έτοιμο για χρήση ***ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ***
Περιεχόμενο: Τετραμεθυλβενζιδίνη 0,26 mg/mL και H_2O_2 0,01% σταθεροποιημένα σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 mol/L (pH 3,8).

H_2SO_4 0.3 M ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (PF93602) 1 x 16 mL ***ΚΟΙΝΟ ΓΙΑ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ***
Διάλυμα H_2SO_4 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 µL διαλύματος

5. ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται στους 2/8°C.
Η ημερομηνία λήξης είναι τυπωμένη σε κάθε σετ και στην εξωτερική ετικέτα της συσκευασίας.

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

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	**ΣΥΝΘΗΚΕΣ**
ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ	5 εβδομάδες στους 2/8°C μέσα στην σακούλα από πολυαιθυλένιο
ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ	5 εβδομάδες στους 2/8°C

ΣΥΖΥΓΕΣ	5 εβδομάδες στους 2/8°C
SORBENT 1	το διάλυμα δεν μπορεί να συντηρηθεί και πρέπει να χρησιμοποιηθεί μετά την ανασύσταση
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 αντιδραστηρι*α που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να αντιμετωπίζονται ως κατάλοιπα δυνητικά μολυσματικά και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις ισχύουσες διατάξεις.*

Οδηγίες για την προσωπική σας ασφάλεια

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

Οδηγίες για την ανάλυση

14. Πριν από την χρήση φέρτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C) Βάλτε και πάλι τα αντιδραστήρια στη συνιστώμενη θερμοκρασία αποθήκευσης, αμέσως μετά τη χρήση. **Η σωστή θερμοκρασία είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την επώαση των ταινιών. Βεβαιωθείτε ό,τι ο θερμοστάτης δεν κατεβαίνει κάτω από τους 35°C και δεν ανεβαίνει πάνω από τους 39°C.**
Ανοίξτε την σακούλα με τις ταινίες (strip) αφού την έχετε αφήσει τουλάχιστον μισή ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

15. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους. Να αποφεύγετε την μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων γιατί αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας του προϊόντος και μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
16. Μην αλλάξετε την όλη Διαδικασία και μην αντικαταστήσετε τα αντιδραστήρια με άλλα διαφορετικής μάρκας ή με άλλα από διαφορετικές παρτίδες, εκτός και αν το αντιδραστήριο είναι κοινό σε όλες τις παρτίδες. Μην μειώνετε τον υποδεικνυόμενο χρόνο επώασης.

17. Όλος ο υάλινος εξοπλισμός πρέπει να απολυμαίνεται προσεκτικά με υδροχλωρικό οξύ 2M και να ξεπλένεται με αποσταγμένο ή με απιονισμένο νερό.
18. Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε ισχυρό φωτισμό ούτε σε υποχλωριώδεις ατμούς, τόσο κατά την αποθήκευσή τους όσο και κατά την επώασή τους.
19. Οι κυψελίδες δεν πρέπει να ξεραίνονται, κατά την διάρκεια των τεστ.
20. Να αποφεύγετε την διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιείτε πάντοτε τις ειδικές πιπέτες.
21. Μην ακουμπάτε το χείλος της κυψελίδας με το συζυγές. Μην φυσάτε πάνω στα μικροπλακίδια.
22. Οι ανοσοενζυμικές αναλύσεις μπορεί να παρουσιάσουν καμιά φορά στα άκρα ένα ειδικό φαινόμενο ("edge effect"), το οποίο μπορεί να ελαχιστοποιηθεί αυξάνοντας τον βαθμό υγρασίας κατά την επώαση. Τα πλακίδια πρέπει να καλύπτονται με το ειδικό κάλυμμα και να επωάζονται στους 37°C ή σε ζεστό υδατόλουτρο, τοποθετώντας τα πάνω σε ένα υποστήριγμα, ή στη συσκευή επώασης. Ως εναλλακτική λύση τα πλακίδια μπορεί να επωαστούν σε έναν κατάλληλο αναλύτη. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε το εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής. Μην χρησιμοποιείτε συσκευές επώασης που λειτουργούν με CO_2.
23. Πριν από την ανάγνωση του πλακιδίου, βεβαιωθείτε ό,τι ο πυθμένας του είναι καθαρός και στεγνός και ό,τι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στην επιφάνεια του υγρού.
24. Τα δείγματα που παρουσιάζουν ισχυρή αιμόλυση, οροί με ατελή πήξη, ή δείγματα που παρουσιάζουν μικροβιακή μόλυνση, μπορεί να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα.
25. Η χρήση ενός κιτ με αυτόματες συσκευές, πρέπει να ελεγχθεί και να επικυρωθεί από τον χρήστη.
26. Διαβάστε με προσοχή το εγχειρίδιο χρήσης κάθε συσκευής που χρησιμοποιείτε, και ειδικά τα εξής σημεία:
    - εγκατάσταση και ειδικές προδιαγραφέςi
    - λειτουργική αρχή, οδηγίες, προφυλάξεις, κίνδυνοι
    - προδιαγραφές του κατασκευαστή και λειτουργικές αποδόσεις της συσκευής
    - συντήρηση και τεχνική υποστήριξη

7. ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

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

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Τεχνική manual

- Προετοιμάστε τις απαραίτητες ταινίες
– Προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας το Wash Buffer 10x (100 ml + 900 ml H_2O)
- Προετοιμάστε τον Sorbent 1 κάνοντας ανασύσταση του κρυο-αφυδατωμένου ροφητή, με τον διαλύτη (ο όγκος που είναι απαραίτητος υποδεικνύεται στην ετικέτα).

Αραιώστε τα δείγματα σε αναλογία 1:101 ρίχνοντας 10 µL ορού σε 1 mL διαλύτη. Αφήστε μία κυψελίδα ελεύθερη για την ανάλυση του τυφλού δείγματος, χρησιμοποιώντας μόνο 100 µL υποστρώματος.
Ρίξτε 30 µL Sorbent 1 και 100 µL από κάθε αραιωμένο δείγμα σε κάθε κυψελίδα (σας συμβουλεύουμε να κάνετε την ανάλυση εις διπλούν).
Σε μία ταινία ρίξτε τους ορούς ελέγχου ΧΩΡΙΣ ΝΑ ΤΟΥΣ ΑΡΑΙΩΣΕΤΕ (100 µL ανά κυψελίδα ***χωρίς τον Sorbent 1***). 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, διαρκείας 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.. Ξεπλύνατε 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. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

STEP 1 Ρίξτε 100 µl ορών ελέγχου (θετικό, αρνητικό και cut off) στις κυψελίδες της ταινίας (χωρίς τον SORBENT)

-

Ρίξτε 30 µL SORBENT 1 και 100 µl αραιωμένου ορού στις κυψελίδες της ταινίας.

-

Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C

-

Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 µl)

-

STEP 2 Ρίξτε 100 µL συζυγούς σε κάθε κυψελίδα

-

Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C

-

Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 µl)

-

STEP 3 Ρίξτε 100 µL Υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα

-

Επωάστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

-

STEP 4 Προσθέστε 100 µL Stop Solution

-

Διαβάστε την Ο.Π. στα 450 nm μέσα σε 30 λεπτά.

10. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Αφαιρέστε την τιμή του τυφλού (<= 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 ελέγχου 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 >= 0,2 στα 450 nm και >= 0,16 στα 450/620 nm.

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος είναι μεγαλύτερη από το Cut-off το δείγμα προκύπτει θετικό λόγω της παρουσίας των ειδικών IgG.
Υπολογίστε τον λόγο (Index) μεταξύ της τιμής της Ο.Π. του υπό ανάλυση δείγματος και εκείνης του Cut-off. Το δείγμα θα κριθεί:

Θετικό: όταν ο λόγος είναι > 1.2.

Αμφίβολο: = ± 20% του Cut-off.

Αρνητικό: όταν ο λόγος είναι < 0.8.

Σε περίπτωση αμφίβολου αποτελέσματος, επαναλάβατε το τεστ. Αν το αποτέλεσμα παραμείνει αμφίβολο επαναλάβατε 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 κιτ 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. Δείγματα με υψηλή τιμή των IgG κατά του HSV 1 μπορεί να επηρεάσουν το τεστ.

14. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Σε έναν κλινικό πειραματισμό, που έγινε σε ένα νοσοκομειακό εργαστήριο, αναλύθηκαν 172 δείγματα. Τα ίδια δείγματα αναλύθηκαν και με μία άλλη ανοσοενζυμική μέθοδο του εμπορίου. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται ως εξής:

Άλλη μέθοδος

		P	N
Diesse	P	18	14
	N	4	136

Διαγνωστική ευαισθησία: 81.8% (IC 95%: 61.5-92.7)
Διαγνωστική ειδικότητα: 90.7% (IC 95%: 84.9-94.4%)

15 . ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Πίν. 1 Ακρίβεια κατά την ανάλυση

Δείγμα	Μ. Τιμή Ο.Π.. .	CV%
HSG1 (n=24)	0.027	9
HSG2 (n=24)	0.561	8
HSG3 (n=24)	1.063	5
Cut Off (n=16)	0.339	6
Θ. Έλ. (n=16)	1.673	5

Πίν. 2 Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων (n=3)

Index	1	2	3	Μ. Τιμή	DS	CV%
Θ. Έλεγχ.	3,08	4,31	4,25	3,9	0,7	18
1	0,32	0,17	0,32	0,3	0,09	33
2	1,65	2,27	2,04	2,0	0,32	16

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. Επαναλάβατε το τεστ.
	Το πλακίδιο δεν αντιδρά	Ελέγξτε των κωδικό στον φάκελο του πλακιδίου (βλ. οδηγίες χρήσης σημείο 4 περί λανθασμένου κωδικού).
		Ελέγξτε αν υπάρχουν ίχνη υγρασίας στο πλακίδιο που δεν αντιδρά. (Η γέλη πυριτίας πρέπει να έχει χρώμα κίτρινο ώχρα). Επαναλάβατε το τεστ.
Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα θετικά)	Μόλυνση του υποστρώματος	Πάρτε μία νέα ποσότητα υποστρώματος
	Ανεπαρκής έκπλυση	Βεβαιωθείτε ό,τι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά.
Χαμηλό επίπεδο ακρίβειας	Ανεπαρκής αναρρόφηση των κυψελίδων	Βεβαιωθείτε ό,τι 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

2. Rawls W.E. et al.: Measurement of antibodies to herpesvirus types 1 and 2 in human sera. J. Immunol. 104: 599 (1970).

INSTRUCCIONES DE USO

ENZYWELL
HERPES SIMPLEX 2 IgG

REF 91026 **(Español)**

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS IgG ANTI HERPES SIMPLEX VIRUS (TIPO 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 oral-faciales, mientras que el HSV-2 es principalmente responsable de lesiones genitales, pero esta dinstinción 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 morbosidad 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 titulación de las IgG específicas es importante para la definición del estado serológico del paciente.

3. PRINCIPIO DEL METODO

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay)
El antígeno, constituido por Herpes Virus tipo 2 purificado e inactivo, está unido a la fase sólida (tiras con 8 pocillos). Después de la incubación con suero humano diluido en una solución con HSV-1 (Sorbent 1), las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno.
Después de varios lavados para eliminar las proteinas 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 substrato 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 antes de su uso.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 pocillos recubiertos de Herpes Simplex Virus Tipo 2
Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (H2, seguido por el número de lote); 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 2 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.
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 2 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.
Color: el color es proporcional al título de los anticuerpos.

WASH BUF 10x TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603) 1 x 100 mL ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Contenido: Solución salina tamponada (PBS), concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.
Preparación: Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir.

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.

SORBENT 1 HSV tipo 1 6 frascos liófilos
Contenido: HSV_1 parcialmente purificado e inactivo in tampón fosfato con lactosa.
Preparación: reconstituir con el volumen de diluyente indicado en etiqueta, agitando por inversión.

CONTROL IgG - IgG CONTROL NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Contenido: Suero humano 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 m*L* ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Contenido: Solución salina tamponada (PBS), concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.
Preparación: Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir.

SAMP DIL 2 DILUYENTE 2 (PF93611) 1 x 100 mL ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Para la dilución de las muestras de suero.
Contenido: Solución de proteínas en tampón fosfato con ázida sódica 0.09% con adición de metilnaranja como conservante.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 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).

H_2SO_4 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL ***INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES***
Solución de H_2SO_4 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)
- Lavador de Microplacas (no indispensable) para dispensar volumenes de 225-375 µl
- Agua Destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas para recoger 10,100,1000 µl de solución
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja .
Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la abertura y/o de la preparación

REACTIVO	**CONDICIONES**
MICROPLACA	5 semanas 2/8°C bolso de plástico
SUEROS DE CONTROL	5 semanas 2/8°C
CONJUGADO	5 semanas 2/8°C
SORBENT 1	la solución no se puede conservar y se debe utilizar después de su reconstitución
SUBSTRATO	hasta la caducidad a 2/8°C ; 1 semana a 15/30°C; en ambiente oscuro
DILUYENTE MUESTRAS	hasta la caducidad a 2/8°C

SOLUCIÓN DE LAVADO	listo para su uso, 2 semanas 2/8°C 5 días a 15/30 °C
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la caducidad a 2/8°C

6. PRECAUCIONES DE USO

SOLAMENTE PARA USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO.

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, segun disposiciones normativas vigentes.

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por via 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 substrato es ácido
   d) Los controles contienen ázida sódica (0.09%) que con plomo y cobre puede formar depósitos explosivos de metalos ázidas.

   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 la otros residuos líquidos se deben disinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1,0%. Se requier una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una disinfección 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 se 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, incluídos 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.**.Abrir el envase con las tiras despu*s de por lo menos media hora a temperatura ambiente.
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 hidroclórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo..
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" (“efecto filo”) que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador**.** Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO_2.

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 micróbiana.
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 –20ºC. Se puede descongelar un máximo de 3 veces. Las muestras no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes. Agitar con cuidado las muestras descongeladas antes de la titulación. La inactivación al calor puede conducir a resultados erróneos. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.
No utilizar muestras muy lipémicas, ictéricas, hemolizadas o contaminadas.
El test no se puede aplicar a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO

Método Manual

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el *Wash Buffer* 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Preparar el Sorbent 1 reconstituyendo el liófilo con el conjugado (volumen indicado en etiqueta) .

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 substrato.
Dispensar 30 µL de sorbent 2 y 100 µL de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los controles SIN DILUIR en una tira (100 µL para cada pocillo ***sin el Sorbent 1***). 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 (DO.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST

PASO 1 Poner 100 µL de controles (positivo, negativo y cut-off) en los pocillos de la tira (sin el SORBENT)

-

Dispensar 30 µL de SORBENT 1 y 100 µl de suero diluido en los pocillos de la tira.

Incubar 45 min. a 37°C

-

Lavar 4 veces (300 µL).

PASO 2 Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo

-

Incubar 45 min. a 37°C

-

Lavar 4 veces (300 µL).

-

PASO 3 Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo

-

Incubar 15 min. a T.A.

-

PASO 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 estar dentro del 25% del valor medio si testado en triple prueba. Descartar cualquier valor anormal y recalcular la media. El valor positivo debe tener D.O. igual por lo menos a 1.5 veces el Cut-off. La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser <= 0.6. La D.O. del cut-off debe ser >= 0,2 a 450 nm e >= 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 (INDEX) 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: ± 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, Citomegalovirus, Parotitis. En ningún caso la presencia de estos anticuerpos afectaba el test. Muestras conteniendo una titulación evaluada de IgG anti HSV 1 pueden afectar el test.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

En una prueba clínica ejecutada en un laboratorio hospitalario, se analizaron 172 muestras. Las muestras fueron analizadas con otro método inmunoenzimático comercial; los resultados están así resumidos:

		Otro método	
		P	N
Diesse	P	18	14
	N	4	136

Sensibilidad diagnóstica: 81.8% (IC al 95%: 61.5-92.7)
Especificidad diagnóstica: 90.7% (IC al 95%: 84.9-94.4%)

15. PRECISIÓN

Tab.1 Precisión intra-ensayo

Maestra	media D.O. .	CV%
HSG1 (n=24)	0.027	9
HSG2 (n=24)	0.561	8
HSG3 (n=24)	1.063	5
Cut Off (n=16)	0.339	6
C. Pos. (n=16)	1.673	5

Tab.2 Precisión en series (n=3)

Index	1	2	3	media	DS	CV%
C Pos	3,08	4,31	4,25	3,9	0,7	18
1	0,32	0,17	0,32	0,3	0,09	33
2	1,65	2,27	2,04	2,0	0,32	16

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 substrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. BIBLIOGRAFÍA

1.Rawls W.E. et al.: Measurement of antibodies to herpesvirus types 1 and 2 in human sera. J. Immunol. 104: 599 (1970).

INSTRUCTIONS POUR L'EMPLOI

ENZYWELL
HERPES SIMPLEX 2 IgG

REF 91026 **(Français)**

1. UTILISATION

MÉTHODE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DÉTERMINATION QUALITATIVE DES ANTICORPS IgG ANTI-HERPES SIMPLEX VIRUS (TYPE 2) DANS LE SÉRUM HUMAIN.

2. INTERET CLINIQUE

Le virus de l'Herpes Simplex (HSV) fait partie de la famille des *Herpesviridiae*, 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 IgG spécifiques est importante pour établir l'état sérologique du patient.

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 2, purifié et inactif, est lié à la phase solide (puits du strip 1x8). Pendant l'incubation avec le sérum humain dilué dans une solution contenant l'HSV-1 (Absorbant 1), 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 l'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

- Le kit permet de réaliser 96 réactions.

- **Porter les réactifs à température ambiante avant l'utilisation.**

MT PLATE MICROPLAQUE 12 x 8 puits sensibilisés avec l'Herpes Simplex Virus type 2
Utilisation : Découper le sachet du côté opposé au code (H2, 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-HSV-2, 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-HSV-2, 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.

SORBENT 1 HSV type 1 lyophilisé, x 6 flacons
Composition : HSV-1 purifié et inactivé en solution phosphate contenant du lactose.
Préparation : Reconstituer avec le volume de conjugué indiqué sur l'étiquette et agiter en renversant.

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 (H_2O_2 à 0.01 %) stabilisé dans un tampon citrate (à 0.05 mol/l). pH = 3.8.

H_2SO_4 0.3 M SOLUTION D'ARRET (PF93602) 1 x 16 mL ***LOTS INTERCHANGEABLES***
Composition : H_2SO_4 (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 nm ou 450/620 nm, avec linéarité jusqu'à >= 2.000)
- Laveur de microplaques (pas indispensable) capable de fournir des volumes de 225-375 µl
- Eau distillée ou désionisée
- Verrerie normale de laboratoire (éprouvettes, pipettes, etc...)
- Micropipette pour le prélèvement précis de 10, 100, 1000 µl de solution
- Gants à jeter
- Compte-minutes
- Solution 5 % de sodium hypochlorite
- 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'aperture et/ou la préparation.

REACTIF	**CONDITIONS**
MICROPLAQUE	5 semaines à 2/8 °C, sachet en polythène
CONTROLES	5 semaines à 2/8 °C
CONJUGUE	5 semaines à 2/8 °C
SORBENT 1	la solution ne peut pas être conservée et il faut l'utiliser dans la journée
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. Bien que tous les produits d'origine humaine aient subi un contrôle de dépistage négatif, concernant les anticorps anti-VIH 1 et 2, les anticorps anti-VHC et l'Ag HBs en utilisant des méthodes approuvées par la FDA, ils doivent cependant être maniés comme étant des produits potentiellement infectieux.

Elimination des résidus: les échantillos de serum et les reactifs usages doivent être traités come des déchets infectés, et donc éliminés conformément aux dispositions de loi en vigueur.

PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS POUR LA SECURITE PERSONNELLE

1. Ne pas pipeter avec la bouche. Porter des gants à jeter et des protections pour les yeux quand on manie des échantillons et pendant le test. Se laver soigneusement les mains une fois que le test est terminé.
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 des canalisations et donner ainsi naissance à des composés explosifs.
   En cas de contact d'un réactif avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
3. Les instruments que ne sont pas à jeter doivent être stérilisés après l'emploi, de préférence en autoclave pendant 1 h à 121 °C. Les matériaux à jeter doivent être mis en autoclave ou incinérés.
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 matériaux liquides à jeter, neutralisés avec une solution alcaline, doivent être désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium en quantité suffisante pour obtenir une concentration finale de 1 % au moins. Une exposition à l'hypochlorite de sodium 1 % pendant 30 minutes suffit pour garantir une désinfection 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, on pourra utiliser l'hypochlorite de sodium seulement après avoir essuyé la zone. Tous les matériaux utilisés pour nettoyer un renversement accidentel doivent être éliminés comme étant potentiellement infectieux.

AVERTISSEMENTS ANALYTIQUES

1. Porter tous les réactifs et les échantillons à la température ambiante (18-30 °C) avant l'emploi. Remettre les réactifs à la température de conservation immédiatement après l'emploi. Il est très important de contrôler la température d'incubation des microplaques. Le thermostat ne doit pas descendre au dessous de 35 °C ni au dessus de 39 °C. Ouvrir le sachet contenant les barrettes après l'avoir laissé 30 minutes à la température ambiante.
2. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption. Eviter la contamination microbienne des réactifs parce que la validité peut se réduire et que les résultats peuvent être erronés.
3. Ne pas changer le procédé, ni remplacer les réactifs avec ceux d'autres producteurs ou d'autres lots, à moins qu'il ne soit précisé que le réactif est interchangeable parmi différents lots. Les temps d'incubation ne doivent pas être réduits.
4. Toute la 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 « dédiées ».
8. Eviter de toucher ou d'éclabousser le bord du puits avec le conjugué. Ne pas souffler sur les microplaques.
9. Les dosages immunoenzymatiques présentent parfois un « effet de bord » (« edge effect ») ; cet effet peut être minimisé en augmentant l'humidité pendant les phases d'incubation. Les microplaques doivent être couvertes avec le couvre-plaque et incubées à 37 °C ou au bain-marie. Autrement, on peut faire incuber les plaques dans une analyseur approprié. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO_2.
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. Des échantillons fortement hémolysés, du sérum non complètement coagulé ou des échantillons présentant une contamination microbienne peuvent entraîner des résultats erronés.

12. L'utilisation du kit avec des instruments automatiques doit être validée par l'utilisateur.
13. Lire attentivement les modes d'emploi des instruments utilisés ; en particulier, il faut prêter attention :
    - à l'installation et aux avertissements spécifiques
    - au principe opérationnel, aux instructions, précautions, risques
    - aux spécifications du producteur et aux performances de l'instrument
    - à la maintenance et à l'assistance technique

7. TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION

L'échantillon peut être constitué par sérum prélevé normalement en observant toutes les précautions prévues dans le laboratoire.
Les sérums frais peuvent être utilisés encore au bout de 4 jours à +2…+8°. Pour un stockage plus long, congeler les sérums à – 20 °C. Peut subir jusqu'à un maximum de troi 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.
Les échantillons présentant une contamination microbienne peuvent fausser les résultats. Si la contamination est perceptible à l'œil nu, l'échantillon doit être éliminé. En outre, il n'est pas possible d'utiliser les échantillons fortement lipémiques, ictériques, hémolysés ou contaminés.
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).
- Préparation de l'Absorbant 1 : reconstituer le lyophilisé avec du diluant (volume indiqué sur l'étiquette).

Exécution
Diluer les échantillons 1 :101 en versant 10µl de sérum dans 1 ml de diluant. Utiliser un puits pour effectuer le blanc, en ajoutant seulement 100 µl de substrat par puits.
Distribuer 30 µl d'Absorbant 1 et 100 µl de chaque échantillon dilué dans les puits (il est conseillé d'effectuer l'analyse en double).
Mettre les contrôles NON dilués dans une barrette (100 µl/puits) ***SANS l'Absorbant*** **1**. Le numéro minimum indispensable est 1 négatif et positif et 2 cut-off. 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 des contrôles dans les puits de la barrette (sans l'absorbant 1)
	Mettre 30 µl d'absorbant 1 et 100 µl des échantillons dilués dans les puits
	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 pendant 30 seconde à 4 reprises (300 µL)
3e ETAPE	Mettre 100 µl de substrat dans les puits.
	Incuber pendant 15 minutes à la température ambiante.
4e ETAPE	Ajouter la solution d'arrêt, 100 µl dans chaque puits

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

10. VALIDATION DU TEST - CONTROLE QUALITE

Lire les absorptions à 450 nm et en déduire la valeur de la D.O du blanc (<= 0.150).
Calculer les valeurs du contrôle seuil. Aucune valeur ne doit s'écarter de plus ± 25 % de la valeur moyenne, 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 <=0,6. La D.O. du contrôle seuil doit être >= 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 en présence d'IgG spécifiques contre l'HSV1.
Calculer le rapport (Indice) entre la valeur d'absorption de l'échantillon et celle du seuil (Index).
L'échantillon est considéré comme étant :
Positif : si le rapport est > 1.2
Incertain: si le rapport est compris 0.8 et 1.2
Négatif : si le rapport est > 0,8

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

12. LIMITES DE LA METHODE

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

Nous avons testé 17 échantillons négatifs à l'Herpes simplex, contenant des anticorps IgG contre Rubella, Epstein Barr, Cytomegalovirus, Parotidite. Le test n'a révélé aucune interférence. La présence d'un haut titre d'anticorps IgG anti-HSV 1 peut provoquer une interférence.

14. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES

172 échantillons ont été analysés lors d'une expérimentation clinique effectuée dans un laboratoire hospitalier. Les résultats ont été comparés avec ceux d'une autre méthode immunoenzymatique . Les résultats sont reportés dans le tableau.

		Autre méthode	
		P	N
Diesse	P	18	14
	N	4	136

Sensibilité diagnostique: 81.8 % (IC à 95 % : 61.5 – 92.7 %)
Spécificité diagnostique : 90.7 % (IC à 95 % : 84.9 – 94.4 %)

15. PRECISION

Tableau 1 Précision dans la série

Echantillon	moyenne D.O.	CV %
HSG1 (n=24)	0.027	9
HSG2 (n=24)	0.561	8
HSG3 (n=24)	1.063	5
Cut Off (n=16)	0.339	6
C. Pos. (n=16)	1.673	5

Tableau 2 Précision entre séries

Index	1	2	3	media	DS	CV%
C Pos	3,08	4,31	4,25	3,9	0,7	18
1	0,32	0,17	0,32	0,3	0,09	33
2	1,65	2,27	2,04	2,0	0,32	16

16. RESOLUTION DES PROBLEMES

PROBLEME	**CAUSES POSSIBLES**	**ACTION/CONTROLE**
Session non valable (tous négatifs)	Absence d'un ou de plusieurs réactifs, ou ajout des réactifs en ordre erroné	Contrôler le processus. 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 le mode d'emploi, paragraphe 4).
		Contrôler s'il y a de l'humidité sur la plaque inutilisée. (Le gel de silice doit présenter une couleur jaune pâle). Refaire le test.
Session non valable (tous positifs)	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
	Ajout des réactifs trop long	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.
	Parcours optique pas propre	Contrôler la source lumineuse et la présence d'impuretés. Essuyer le fond de la plaque avec du papier.
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 incorrect du substrat ajouté à la plaque	Contrôler le fonctionnement de la pipette.

17. BIBLIOGRAPHIE

1. Rawls W.E. et él.: Measurement of antibodies to herpesvirus types 1 and 2 in human sera. J. Immunol. 104: 599 (1970).

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ENZYWELL
HERPES SIMPLEX 2 IgG

REF 91026 **(Português)**

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

KIT MONO-ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE ANTICORPOS DE CLASSE IgG DE HERPES SIMPLEX VÍRUS (TIPO 2) NO SORO HUMANO, COMO UMA AJUDA NO DIAGNÓSTICO DE HERPES SIMPLEX VÍRUS.

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 IgG específico é importante para definir o estado sorológico do paciente.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O teste é baseado na técnica ELISA (Ensaio de imuno-absorção enzimática).
O antigénio, composto de Vírus de Herpes de tipo 2 purificados e inactivados, liga-se à fase sólida (barras de oito poços). As imunoglobulinas são ligadas ao antigénio por incubação com soro humano diluído numa solução contendo HSV-1 (Sorbent 1).
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 (Tipo 2).
Utilização: Abra a embalagem no lado oposto do código (H2 mais o número do lote), que é útil para fins de identificação; retire o suporte e as tiras necessárias. Recolocar as outras não utilizadas no saco de polietileno com o gel de sílica esvaziar o ar e fechar o pacote premindo o fecho.

CONTROL + CONTROLO POSITIVO 1 x 1.6 mL
Conteúdo: Soro humano que contém anticorpos IgG anti-HSV (Tipo 2), diluído em tampão de fosfato 0.01 mol/L contendo BSA 1% e Azida de Sódio 0.09%. Líquido, pronto a usar.
Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao grau relativo de anticorpos.

CONTROL CUT-OFF CONTROLO CUT-OFF 1 x 2 mL
Conteúdo: Soro humano que contém anticorpos IgG anti-HSV (Tipo 2), diluído em tampão de fosfato 0.01 mol/L contendo BSA 1% e Azida de Sódio 0.09%. Líquido, pronto a usar.
Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao grau relativo de anticorpos.

CONJ CONJUGADO 1 x 16 mL
Conteúdo: anticorpos monoclonais anti-IgG humanas marcados com peroxidase, numa solução tampão de fosfato contendo fenol 0.05% e Bronidox 0.02%. Líquido, pronto a usar.

SORBENT 1 HSV (Tipo 1) Pó seco-congelado x 6 frascos
Conteúdo: HSV-1 purificados e inactivados numa tampão fosfatado e lactose.
Preparação: reconstitua com volume diluente mostrado na etiqueta, misturando por inversão.

CONTROL IgG - IgG CONTROLO NEGATIVO (PF93910) 1 x 1.6 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
Conteúdo: Soro humano em tampão de fosfato 0.01 mol/L contendo BSA 1% e Azida de Sódio 0.09%. Líquido, pronto a usar.

WASH BUF 10x TAMPÃO DE LAVAGEM 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
Conteúdo: Solução salina tamponada (PBS), concentrada 10 vezes, que contém 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 37ºC antes da diluição.

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 (PF93611) 1x100 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
Para diluição de amostras de soro
Conteúdo: Solução proteica em tampão fosfatado com Azida de Sódio 0.09% adicionado de metil-orange como corante.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x 12 mL Prontos a usar **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
Pronto a usar.
Conteúdo: Tetrametilbenzidina a 0.26 mg/mL e H_2O_2 0.01% estabilizado num tampão de citrato a 0.05 mol/L (pH 3.8).

H_2SO_4 0.3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602) 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**
H_2SO_4 0.3 mol/L, em solução pronta a ser usada.

PELÍCULAS ADESIVAS (2)
SACO DE POLIETILENO (1)

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

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

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DE REAGENTES

Os reagentes devem ser mantidos a 2/8°C.
A data de validade está impressa em cada componente e na etiqueta da embalagem.

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

REAGENTE	CONDIÇÕES
MICROPLACA	5 semanas a 2/8°C, saco de polietileno
SOROS DE CONTROLO	5 semanas a 2/8°C
CONJUGADO	5 semanas a 2/8°C
SORBENT 1	a solução não é estável e deve ser usada logo após a reconstituição
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	(pronto a ser usado) 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.

Este kit contém materiais de origem humana com os quais foram testados de acordo com os testes aprovados pela FDA e os resultados foram negativos para a presença de HBsAg, anticorpos anti-HIV-1, anti HIV-2 e anti-HCV. Visto que nenhum teste de diagnóstico pode oferecer uma garantia completa em relação à ausência de agentes infecciosos, todos os materiais de origem humana precisam ser considerados potencialmente infectados. Todos os reagentes e as amostras devem ser manuseados conforme as regras de segurança definidas em cada laboratório.

Eliminação de resíduos: as amostras de soro e os reagentes utilizados devem ser tratados como resíduos infectados e, portanto, devem ser eliminados de acordo com as disposições de lei em vigor.

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 substracto é ácido
   d) Os controlos contêm Azida de Sódio a 0.09% que pode reagir com chumbo e cobre nos canos e formar depósitos altamente explosivos de azidas metálicas.

   Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou olhos, lave a área profusamente com água.
3. Aparelhos não descartáveis devem ser esterilizados após a utilização. O método preferido é a autoclave para 1 hora a 121°C; os descartáveis devem ser colocados em autoclave ou incinerados.
4. O ácido sulfúrico necessário para a solução de paragem e ácido hidroclórico usado na lavagem de recipientes de vidros são corrosivos e devem ser manuseados com atenção apropriada. Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou olhos, lave a área profusamente com água.
5. Ácidos neutralizados e outros líquidos dispensáveis devem ser descontaminados juntando um volume suficiente de hipoclorito de sódio para obter uma concentração final de pelo menos 1%. 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%, 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 correta para a incubação das tiras. Certificar-se de que o termóstato não fique abaixo de 35ºC nem acima de 39ºC.**

   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 hidroclórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada.
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 analizador aprovado. Veja o manual de instruções apropriado para mais detalhes. Os incubadores de CO_2 não devem ser utilizados.

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

7. TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

O tipo de amostra é representado por soro, obtido de sangue recolhido das veias e manuseado de acordo com os procedimentos standard de laboratório. O soro fresco pode ser guardado durante 4 dias a 2/8°C, ou congelado por períodos mais longos a –20°C, e pode ser descongelado um máximo de três vezes. Evite a utilização de congeladores autodescongeláveis para armazenamento de amostras. Amostras descongeladas devem ser cuidadosamente batidas antes de efectuar o teste. Inactivação de calor pode levar a resultados erróneos. A qualidade da amostra pode ser seriamente afectada por contaminação microbiana que leve a resultados erróneos.
Amostras fortemente lipémicas, ictéricas ou contaminadas devem ser evitadas.
O teste não pode ser executado em plasma humano.

8. PROCEDIMENTO DE TESTE

Técnica manual

- Prepare a quantidade necessária de tiras
- Prepare o tampão de lavagem diluindo o tampão de lavagem 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Prepare o Sorbent 1 reconstituindo o produto seco com o diluente (volume relatado na etiqueta).

Amostras diluídas 1:101 distribuindo 10 µL de soro em 1mL de diluente. Deixe um poço para o branco, executando com a utilização de 100 µL de mistura de substrato.
Coloque 30 µL de Sorbent 1 e 100 µL de cada amostra diluída por poço (testes duplicados são recomendados). Coloque controles (NÃO DILUÍDOS) numa tira (100 µL em cada poço **sem o Sorbent 1**). O requisito mínimo é 1 controlo negativo, 2 de Cut-Off e 1 positivo.
Os poços são cobertos com filme protector e incubados durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar 4 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 4 vezes, como está descrito acima. Finalmente, o substracto é distribuído (100 µL/poço). Após 15 minutos à temperatura ambiente, a reacção enzimática é parada com 100 µL de solução de paragem. A adsorbância (D.O.) é lida a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE

PASSO 1 Coloque 100 µL de controles (positivo, negativo e Cut-Off) nos poços das tiras (sem SORBENT)

-

Coloque 30 µL de SORBENT 1 e 100 µL de amostra diluída nos poços das tiras

-

Incube durante 45 minutos a 37°C

-

Lave 4 vezes (300 µL)

-

PASSO 2 Junte 100 µL de conjugado a cada poço

-

Incube durante 45 minutos a 37°C

-

Lave 4 vezes (300 µL)

-

PASSO 3 Junte 100 µL de substracto 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. VALIDAÇÃA DO TESTE

Subtraia o valor do nulo (≤ 0.150) de todas as outras leituras. Os valores D.O. do soro de controlo Cut-Off quando forem testados em triplicado devem estar dentro do valor médio de 25%. Ignore qualquer valor anormal e recalcule o médio. O controlo positivo deve ter uma D.O. de pelo menos 1.5 vezes a do soro de Cut-Off. A relação entre Controlo Negativo e Cut-Off 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 de Cut-Off, a amostra é positiva para a presença de IgG específico.
Calcule a relação entre o valor DO da amostra e a do valor de Cut-Off (ÍNDICE). A amostra é considerada:

Positiva: se a relação for > 1.2.

Duvidosa: ± 20% do valor de Cut-Off.

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 simplex IgM. Como alternativa, uma segunda amostra de soro obtida 8-14 dias mais tarde, 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 foram testadas e foram negativas para Herpes Simplex, contendo anticorpos IgG contra a Rubeola, Epstein Barr, Citomegalovirus e Papeira. A presença destes anticorpos não causam qualquer interferência no teste. Amostras que contenhas tiutlos altos de anti-HSV 1 podem causar interferências.

14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

Numa experimentação foram analisadas 172 amostras com um outro kit do mercado.
De seguida, os dados da experimentação:

		Outro kit	
		P	N
Diesse	P	18	14
	N	4	136

Sensibilidade diagnóstica: 81.8% ($CI_{95\%}$: 61.5-92.7%)
Especificidade diagnóstica: 90.7% ($CI_{95\%}$: 84.9-94.4%)

15. PRECISÃO

Tab. 1 Precisão no teste

Amostra	Média D.O. .	CV%
HSG1 (n=24)	0.027	9
HSG2 (n=24)	0.561	8
HSG3 (n=24)	1.063	5
Cut Off (n=16)	0.339	6
C. Pos. (n=16)	1.673	5

Tab. 2 Precisão entre testes (n=3)

Amostra	Amostra/Cut-Off			Média	S.D.	CV%
C. Pos.	3.08	4.31	4.25	3.9	0.7	18
1	0.32	0.17	0.32	0.3	0.09	33
2	1.65	2.27	2.04	2.0	0.32	16

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 substracto.
	Lavagem inadequada	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
Pouca precisão	Lavagem incompleta dos poços	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
	Aspiração inadequada de poços	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
	Erro de pipetagem	Verifique a função de pipetagem
	A adição de reagente é muito lenta	Evite a secagem da placa após o passo de lavagem. Adicione os reagentes imediatamente
	Presença de bolhas	Evite bolhas de ar durante a pipetagem.
	A passagem óptica não está limpa	Verifique se o instrumento luminoso e o detector têm sujidade. Limpe a parte inferior da placa com um pano suave.
Desenvolvimento inadequado de cor.	Tempos ou temperatura de incubação inadequados	Verifique o controlo de temperatura e a monitorização do tempo.
		Observe as instruções recomendadas de utilização.
	Volume inadequado do substracto adicionado à placa	Verifique a função de pipetagem

17. REFERÊNCIAS

1. Rawls W.E. et al.: Measurement of antibodies to herpesvirus types 1 and 2 in human sera. J. Immunol. 104: 599 (1970).

	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 jusque 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 Fabbricante	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 «ν» 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

	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 jusque 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 Fabbricante	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 «ν» 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

IVD	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
LOT	EN ES IT	Batch code Código de lote Codice del lotto	FR GR PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote

CE

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