



ENZYWELL

HERPES SIMPLEX 2 IgM

REF 91025 (96 tests)

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



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 EXPLICAÇÃO 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 ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ / COMPONENTES DEL
KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS / CONTEÚDA
DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE /
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF
REAGENTS / 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 / VALIDAÇÃO 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 IgM

REF 91025

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO A CATTURA PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgM 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 IgM specifiche è importante per la diagnosi di infezione neonatale e di encefalite da HSV. Inoltre la presenza di IgM specifiche è indice di attività virale in atto, anche se non permette di discriminare tra infezione primaria e riattivazione.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test per il dosaggio delle IgM anti HSV tipo 2 si basa sul principio della cattura di queste immunoglobuline e successiva rivelazione di quelle specifiche sfruttando la loro capacità di legare un antigene coniugato a perossidasi.

La cattura si effettua con anticorpi monoclonali legati alla fase solida (pozzetti di microtiter). L'antigene è costituito da Herpes Simplex Virus di tipo 2, purificato ed inattivato marcato con perossidasi legata a monoclonali specifici anti-HSV tipo 2.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.

Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.

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

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

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1x1.6 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi anti-HSV IgM tipo 2, in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

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

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi anti-HSV IgM tipo 2, in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

Ag ANTIGENE Liofilo x 6 fiale

Contenuto: Herpes Simplex Virus tipo 2 purificato, in tampone fosfato contenente liquido ascitico di topo e lattosio.

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

CONJ CONIUGATO 1x18 mL

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti-HSV tipo 2 marcati con perossidasi, in tampone fosfato contenente fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%.

Preparazione: pronto all'uso.

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

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

Contenuto: Siero umano in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

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

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

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

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

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con sodio azide 0,09% più colorante (metilarancio).

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x 12 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Pronto all'uso.

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

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

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

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

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

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

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

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

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

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

6. PRECAUZIONI

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

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

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

Avvertenze per la sicurezza personale

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

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

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**
Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO₂.
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 automatico 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 C e può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima del dosaggio L'inattivazione al calore può fornire risultati erranei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati.

Il test non è applicabile 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 H₂O).
- Preparare l'immunocomplesso, ricostituendo il liofilo con il coniugato (volume indicato in etichetta).

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

9. SCHEMA DEL SAGGIO

Tecnica manuale

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

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Togliere il valore del bianco (≤ 0.150) a tutte le altre letture. I valori in O.D. del siero di controllo Cut-off devono essere entro il 25% del valore medio se testato in triplicato. Scartare eventualmente il valore aberrante e ricalcolare la media. Il positivo deve avere O.D. pari almeno a 1.5 volte il Cut-off. Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere ≤ 0.6 . La DO del cut-off deve essere $\geq 0,2$ 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 IgM specifiche per l'antigene.

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

Positivo: quando il rapporto è > 1.2 .

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

Negativo: quando il rapporto è < 0.8 .

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

Non si può escludere totalmente la cross reazione con le IgM anti-HSV 1 IgM. Per migliorare la specificità si consiglia di abbinare i due test per il tipo 1 e tipo 2 acquistando anche il codice 91028. Confrontando le OD ottenute nei due kit con lo stesso siero si può utilizzare il seguente criterio: si calcolano i due indici rispetto al cut-off ed il rapporto fra l'indice tipo 1 e quello tipo 2. Per valori di rapporto inferiori a 0,7 è individuato come agente infettante il tipo 2; per valori superiori a 1,3 è individuato il tipo 1. Per valori intermedi risulta indeterminabile il tipo di HSV che ha provocato l'infezione.

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

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

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

E' documentata la cross reazione tra sierotipo 1 e 2, non è esclusa quindi la risposta dell' 1 verso il 2 e viceversa.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Campioni contenenti potenziali interferenti quali Fattore Reumatoide, bilirubina e trigliceridi non sembravano influenzare il test. In qualche caso è stata verificata l'interferenza da anticorpi IgM anti-Epstein Barr Virus e Cytomegalovirus.

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

La sensibilità diagnostica del kit Enzywell Herpes Simplex 2 IgM è stata testata su 292 campioni di cui 49 appartenenti a soggetti della sieroteca, il resto proveniva dalla routine di laboratorio. Dei 49 campioni 17 contenevano anticorpi IgM anti-Herpes 1+2 e tra questi, 10 non mostravano reattività verso l'Herpes simplex sierotipo 2. Il dato veniva confermato testando gli stessi campioni con un kit del commercio basato sul principio della competizione e specifico per la determinazione qualitativa degli anticorpi anti-Herpes Simplex tipo 2.

Tra i restanti campioni, 280 risultavano negativi e 5 falso positivo. La tabella seguente riassume i dati:

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	7	5
	-	0	280

Il kit Enzywell Herpes Simplex 2 IgM mostrava avere una sensibilità diagnostica del 100%(I.C. al 95%: 64.6-100%) ed una specificità diagnostica del 98.2% (I.C. al 95%: 96.0-99.3%).

15. PRECISIONE

Precisione entro la seduta

Cut Off n = 21	Lotto 058	Lotto 062	Lotto 064
D.O.	0.434	0.393	0.383
CV%	6	7,0	8,6

Precisione fra sedute

	Lotto numero								
	056		058		064				
Campione	O.D.	Camp/Cut-off	O.D.	Camp/Cut-off	O.D.	Camp/Cut-off	Media	S.D.	CV%
Contr. Pos.	1.804	3.72	1.708	3.72	2.148	4.21	3.90	0.30	8
Cut off	0.485	1.00	0.459	1.00	0.51	1.00	1.00	0.00	0
Contr. Neg.	0.102	0.21	0.095	0.21	0.043	0.08	0.20	0.08	18
HMM 1	0.416	0.86	0.306	0.67	0.384	0.75	0.80	0.10	16
HMM 2	0.813	1.68	0.794	1.73	0.687	1.35	1.60	0.20	24
HMM 3	1.812	3.74	1.742	3.80	2.036	3.99	3.8	0.13	24

16. GUIDA AI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBILI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi istruzioni per l'uso paragrafo 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. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. S. Land et al.: Rapid diagnosis of herpes simplex virus infections by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 19: 865 (1984).
3. B. Gonik et al.: Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 29: 436 (1991).
4. C. Gleaves et al.: Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of herpes simplex virus (HSV) antigen from clinical specimens in viral transport media. J. Virological Meth. 28: 133 (1990).
5. M. Morgan and T. Smith: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of herpes simplex virus antigen. J. Clin. Microbiol. 19: 730 (1984).

6. D. Ho et al.: Indirect ELISA for the detection of HSV-2 specific IgG and IgM antibodies with glycoprotein G (gG-2). *J. Virological Meth.* 36: 249 (1992).
7. R. Eberle et al.: The immune response to herpes simplex virus: comparison of the specificity and relative titers of serum antibodies directed against viral polypeptides following primary herpes simplex virus type 1 infections. *J. Med. Virology* 16: 1247 (1985).
8. J.E. Kuhn et al.: Analysis of the IgM and IgG antibody response against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) structural and nonstructural proteins. *J. Medical Virology* 23: 135 (1987).



INSTRUCTIONS FOR USE

ENZYWELL HERPES SIMPLEX 2 IgM

REF 91025

(English)

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC CAPTURE METHOD FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgM-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 IgM is important for the diagnosis of neonatal infection and encephalitis caused by HSV. Moreover, the presence of specific IgM indicates viral activity in progress, although it is not possible to distinguish between primary infection and reactivation.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

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

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 96 determinations.

Bring to room temperature before use.

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

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

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1 x 1.6 mL

Contents: Diluted human serum, at known concentration of anti-HSV 2 IgM, in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

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

CONTROL CUT-OFF CUT OFF CONTROL 1 x 2.5 mL

Contents: Diluted human serum, at known concentration of anti-HSV 2 IgM, in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

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

Ag ANTIGEN Freeze-dried powder x 6 vials

Contents: Purified Herpes Simplex Virus type 2, in Phosphate buffer with mouse ascitic fluid and lactose.

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

CONJ CONJUGATE 1x18 mL

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

Preparation: ready for use. The immunocomplex should be prepared about 45 min. before use.

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

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

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

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

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

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

To be used to dilute samples.

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

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

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

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

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

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

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

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

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

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

Caution:

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

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

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
 - a) The Wash Buffer contains detergents
 - b) The conjugate contains phenol
 - c) The substrate is acid
 - d) The controls contain 0.9% 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 Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If they come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
5. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature.
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO₂ incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. Use of the kit with automatic instruments must be validated by the user.
13. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:

- installation and particular requisites
- operating principles, instructions, precautions and risks
- manufacturer's specifications and instrument performance
- servicing and maintenance

7. **TYPE AND STORAGE OF SAMPLE**

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at -20°C and can be thawed a maximum of 3 times. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted samples must be carefully mixed before 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**

Manual Technique

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Prepare the immunocomplex by reconstituting the freeze-dried powder with the conjugate (volume shown on the label).

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

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

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

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

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

Manual Technique

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

-

Incubate for 45 min. at 37°C

-

Wash 4 times (300 µL)

STEP 2 Add 100 µL of immunocomplex to each well

-

Incubate for 45 min. at 37°C

-

Wash 4 times (300 µL)

STEP 3 Add 100 µL of Substrate to each well

-

Incubate for 15 min. at R.T.

STEP 4 Add 100 µL of Stop Solution

-

Read absorbance at 450 nm within 30 min

10. **VALIDATION OF THE TEST**

Subtract the value of the blank (≤ 0.150) from all the other readings. The O.D. values of the control Cut-off serum must be within 25% of the mean value if tested in triplicate. Disregard any abnormal value and recalculate the mean.

The Positive control must have an O.D. at least 1.5 times that of the Cut-Off serum. The ratio between Negative Control and Cut-off must be ≤ 0.6 . The OD of the Cut off must be ≥ 0.2 at 450 nm and ≥ 0.16 at 450/620 nm.

11. INTERPRETATION OF RESULTS

Qualitative results

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

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

Positive: if the ratio is > 1.2 .

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

Negative: if the ratio is < 0.8 .

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

The possibility of cross reaction with anti-HSV type 1 antibodies cannot be completely excluded. To improve the specificity it is recommended to perform the test for both type 1 and type 2, using product code 91028. By comparing the OD obtained on the same sample with the two kits the following criterium can be adopted: two indexes compared to the cut-off value. and the ratio between the index for type 1 and the index for type 2 are calculated. When the ratio is below 0.7, the infecting agent is type 2; when the value is higher than 1.3, type 1 is the infecting agent. In the case of intermediate values it is not possible to determine the type of HSV which has caused the infection.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

Paired specimens are required for determining serum-conversion. Collect the first specimen as soon as possible after onset of symptoms, and the second specimen 2-3 weeks later. If the first sample is taken too late during the course of infection, serum-conversion may not be detected. If the test results obtained for paired samples are inconclusive, reassay the specimens.

Cross reaction between serotypes 1 and 2 has been documented, and this cannot therefore be excluded.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

Potentially interfering substances such as Rheumatoid Factor, bilirubin and triglycerides appear not to influence the test. In some cases the interference of IgM antibodies anti-Epstein Barr and Cytomegalovirus has been demonstrated.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The diagnostic sensitivity and specificity of the Enzywell Herpes Simplex 2 IgM kit was studied on 292 samples, 49 of which came from the serum collection and the rest from the routine practice. Of these 49 samples, 17 contained anti-Herpes 1+2 IgM and 10 of these did not show reactivity towards Herpes simplex serotype 2. This result was confirmed by testing the same samples with a commercial kit based on the "competition" principle and specific for the qualitative determination of anti-Herpes Simplex type 2 antibodies.

Of the remaining samples, 280 were negative and 5 false positive. The table summarizes the results.

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	7	5
	-	0	280

The Enzywell Herpes Simplex 2 IgM kit showed a diagnostic sensitivity of 100% (I.C. at 95%: 64.6% - 100%) and diagnostic specificity of 98,2% (I.C. at 95%: 96.0 – 99.3%).

15. PRECISION

Within run Precision

Cut Off n = 21	Lot 058	Lot 062	Lot 064
O.D..	0.434	0.393	0.383
CV%	6	7,0	8,6

Between run Precision

	Lot number								
	056		058		064				
Sample	O.D.	Sample/Cut-off	O.D.	Sample/Cut-off	O.D.	Sample/Cut-off	Media	S.D.	CV%
Pos. Control	1.804	3.72	1.708	3.72	2.148	4.21	3.90	0.30	8
Cut off	0.485	1.00	0.459	1.00	0.51	1.00	1.00	0.00	0
Neg. Control	0.102	0.21	0.095	0.21	0.043	0.08	0.20	0.08	18
HMM 1	0.416	0.86	0.306	0.67	0.384	0.75	0.80	0.10	16
HMM 2	0.813	1.68	0.794	1.73	0.687	1.35	1.60	0.20	24
HMM 3	1.812	3.74	1.742	3.80	2.036	3.99	3.8	0.13	24

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 for correct code).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel dessiccant must be pale yellow).Repeat test
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Take new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that wash apparatus works well
Poor precision	Incomplete washing of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Inadequate aspiration of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Reagent addition too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of bubbles	Avoid air bubbles during pipetting.
	Optical pathway not clean	Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft tissue.
Inadequate Color development	Incorrect incubation times or temperature	Check for temperature control and time monitoring
		Adhere to recommended instruction for use.
	Inadequate volume of substrate added to the plate	Check pipette function.

17. REFERENCES

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



ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ
ENZYWELL
IgM ΑΠΛΟΥ ΕΡΠΗΤΑ 2

REF 91025

(Ελληνικά)

1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΛΛΗΨΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ IgM 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 ελάχιστονες αντιγονικές διαφορές. Ο HSV-1 προκαλεί κυρίως έλκη στόματος-προσώπου ενώ ο HSV-2 έλκη γεννητικών οργάνων, αλλά αυτή η διάκριση είναι απλά ενδεικτική γιατί και οι δύο τύποι μπορεί να γίνουν αίτιοι λοίμωξης και στις δύο περιοχές. Επιπλέον ο HSV μπορεί να προκαλέσει μία μορφή οφθαλμικής κερατίτιδας και βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

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

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

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τεστ προσδιορισμού των IgM κατά του HSV 2 βασίζεται στην αρχή της σύλληψης και της συλλογής αυτών των ανοσοσφαιρινών και στην μετέπειτα ανίχνευση των ειδικών, εκμεταλλευόμενοι την ικανότητά τους να συνδέονται με το αντιγόνο συζευγμένο με υπεροξειδάση.

Η σύλληψη και συλλογή γίνεται με μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα με τη στερεά φάση (κυψελίδες με μικροπλακίδια στη συσκευή). Το αντιγόνο αποτελείται από ιό Απλού Έρπητα 2, κεκαθαρμένο και αδρανοποιημένο σεσημασμένο με υπεροξειδάση συνδεδεμένη με μονοκλωνικά ειδικά αντισώματα κατά του HSV 2.

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 96 τεστ.

Φέρετε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από τη χρήση.

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

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

CONTROL + ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΘΕΤΙΚΟΣ 1x1.6 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός με γνωστή συγκέντρωση αντισωμάτων IgM κατά του HSV 2, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο του νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αντισωμάτων.

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

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός με γνωστή συγκέντρωση αντισωμάτων IgM κατά του HSV 2, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο του νατρίου 0,09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αντισωμάτων.

Ag ANTIGONO Κρυο-αφυδατωμένο x 6 αμπούλες.

Περιεχόμενο: Ιός Απλού Έρπητα 2 κεκαθαρμένος, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει υγρό ασκιτή μυός και γαλακτόζη.

Προετοιμασία: Για την ανασύσταση προσθέστε τον όγκο του συζυγούς που αναγράφεται στην ετικέτα και στη συνέχεια ανακινήστε το αναποδογυρίζοντάς το.

CONJ ΣΥΖΥΓΕΣ 1x18 mL

Περιεχόμενο: διάλυμα μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά του HSV 2 σεσημασμένων με υπεροξειδάση, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη 0,05% και Bronidox 0,02%.

Προετοιμασία: έτοιμο για χρήση.

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

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

ΠΑΡΤΙΔΕΣ

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

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

ΠΑΡΤΙΔΕΣ

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

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

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

Χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων.

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

SUBS TMB ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (PF93619) 1x 12 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Έτοιμο για χρήση.

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

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

Διάλυμα H₂SO₄ 0.3 mol/L έτοιμο για χρήση.

ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΤΑΙΝΙΑ (2).

ΣΑΚΟΥΛΑ ΑΠΟ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟ (1).

ΑΛΛΟ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ ΑΛΛΑ ΜΗ ΣΥΝΟΔΕΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

- Επωαστήριο σε 37°C
- Αναγνώστης μικροπλακιδίων (μήκος κύματος 450 ή 450/620 nm και 405 nm, με γραμμικότητα μέχρι Ο.Π. >= 2,000)
- Συσκευή έκπλυσης μικροπλακιδίων (μη απαραίτητη) ικανότητας 225-375 μL
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
- Γάντια μίας χρήσης
- Χρονόμετρο
- Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5%
- Δοχεία για την απόρριψη των δυνητικά μολυσματικών υλικών.
- Απορροφητικό χαρτί
- Στάνταρντ υάλινος εξοπλισμός εργαστηρίου: κύλινδροι, δοκιμαστικοί σωλήνες, κ.λ.π.
- Μικροπιπέτες που αναρροφούν με ακρίβεια όγκους 10,100,1000 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

ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΝ ΑΝΤΙΓΟΝΟ

πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός της ημέρας. Δεν μπορεί να καταψυχθεί

ΣΥΖΥΓΕΣ

5 εβδομάδες στους 2/8°C

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

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

ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ

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

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

6. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΟΔΗΓΙΕΣ***ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΤΕ ΣΤΟΥΣ 2-8°C*****Προσοχή:**

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

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

Οδηγίες για την προσωπική σας ασφάλεια

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

Οδηγίες για την ανάλυση

14. Πριν από την χρήση φέρτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C) Βάλτε και πάλι τα αντιδραστήρια στη συνιστώμενη θερμοκρασία αποθήκευσης, αμέσως μετά τη χρήση. **Η σωστή θερμοκρασία είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την επώαση των ταινιών. Βεβαιωθείτε ότι ο θερμοστάτης δεν κατεβαίνει κάτω από τους 35°C και δεν ανεβαίνει πάνω από τους 39°C.**
Ανοίξτε την σακούλα με τις ταινίες (strip) αφού την έχετε αφήσει τουλάχιστον μισή ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
15. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους. Να αποφεύγετε την μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων γιατί αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας του προϊόντος και μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.

16. Μην αλλάξετε την όλη Διαδικασία και μην αντικαταστήσετε τα αντιδραστήρια με άλλα διαφορετικής μάρκας ή με άλλα από διαφορετικές παρτίδες, εκτός και αν το αντιδραστήριο είναι κοινό σε όλες τις παρτίδες. Μην μειώνετε τον υποδεικνυόμενο χρόνο επώασης.
17. Όλος ο υάλινος εξοπλισμός πρέπει να απολυμαίνεται προσεκτικά με υδροχλωρικό οξύ 2M και να ξεπλένεται με αποσταγμένο ή με απιονισμένο νερό.
18. Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε ισχυρό φωτισμό ούτε σε υποχλωριώδεις ατμούς, τόσο κατά την αποθήκευσή τους όσο και κατά την επώασή τους.
19. Οι κυψελίδες δεν πρέπει να ξεραίνονται, κατά την διάρκεια των τεστ.
20. Να αποφεύγετε την διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιείτε πάντοτε τις ειδικές πιπέτες.
21. Μην ακουμπάτε το χέιλος της κυψελίδας με το συζυγές. Μην φυσάτε πάνω στα μικροπλακίδια.
22. Οι ανοσοενζυμικές αναλύσεις μπορεί να παρουσιάσουν καμιά φορά στα άκρα ένα ειδικό φαινόμενο ("edge effect"), το οποίο μπορεί να ελαχιστοποιηθεί αυξάνοντας τον βαθμό υγρασίας κατά την επώαση. Τα πλακίδια πρέπει να καλύπτονται με το ειδικό κάλυμμα και να επωάζονται στους 37°C ή σε ζεστό υδατόλουτρο, τοποθετώντας τα πάνω σε ένα υποστήριγμα, ή στη συσκευή επώασης. Ως εναλλακτική λύση τα πλακίδια μπορεί να επωαστούν σε έναν κατάλληλο αναλύτη. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε το εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής. Μην χρησιμοποιείτε συσκευές επώασης που λειτουργούν με CO₂.
23. Πριν από την ανάγνωση του πλακιδίου, βεβαιωθείτε ότι ο πυθμένας του είναι καθαρός και στεγνός και ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στην επιφάνεια του υγρού.
24. Τα δείγματα που παρουσιάζουν ισχυρή αιμόλυση, οροί με ατελή πήξη, ή δείγματα που παρουσιάζουν μικροβιακή μόλυνση, μπορεί να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα.
25. Η χρήση ενός κιτ με αυτόματες συσκευές, πρέπει να ελεγχθεί και να επικυρωθεί από τον χρήστη.
26. Διαβάστε με προσοχή το εγχειρίδιο χρήσης κάθε συσκευής που χρησιμοποιείτε, και ειδικά τα εξής σημεία:
 - εγκατάσταση και ειδικές προδιαγραφές
 - λειτουργική αρχή, οδηγίες, προφυλάξεις, κίνδυνοι
 - προδιαγραφές του κατασκευαστή και λειτουργικές αποδόσεις της συσκευής
 - συντήρηση και τεχνική υποστήριξη

7. ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

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

Δείγματα με ισχυρή αιμόλυση, με ίκτερο, λιπαιμικά ή μολυσμένα, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται.

Το τεστ δεν μπορεί να γίνει πάνω σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Τεχνική manual

- Προετοιμάστε τις απαραίτητες ταινίες.
- Προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας το Wash Buffer 10x (100 ml + 900 ml H₂O)
- Προετοιμάστε το ανοσοσύμπλοκο, κάνοντας την ανασύσταση του κρυο-αφυδατωμένου, με το συζυγές (ο όγκος που είναι απαραίτητος υποδεικνύεται στην ετικέτα).

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

9. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Τεχνική manual

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

10. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

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

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Ποιοτικά αποτελέσματα

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

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

Θετικό: όταν ο λόγος είναι > 1.2 .

Αμφίβολο: $= \pm 20\%$ του Cut-off.

Αρνητικό: όταν ο λόγος είναι < 0.8 .

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

Δεν μπορεί να αποκλειστεί τελείως η περίπτωση διασταυρούμενης αντίδρασης με τα IgM αντι-HSV 1. Για την βελτιστοποίηση της ειδικότητας, σας συμβουλεύουμε να συνδυάσετε τα δύο τεστ, για τον τύπο 1 και για τον τύπο 2, αγοράζοντας και των κωδικό 91028. Συγκρίνοντας τις Ο.Π. που βρήκατε με τον ίδιο ορό και στα δύο kit, μπορείτε να χρησιμοποιήσετε το εξής κριτήριο: υπολογίζονται οι δύο δείκτες ως προς το cut-off και τη σχέση μεταξύ του δείκτη του τύπου 1 και του τύπου 2. Για τιμές κατώτερες του 0,7 καθορίζεται ως παράγοντας της λοίμωξης ο τύπος 2. Σε περίπτωση τιμών μεγαλύτερων του 1,3 καθορίζεται ως παράγοντας της λοίμωξης ο τύπος 1. Για τις ενδιάμεσες τιμές δεν είναι δυνατόν να καθοριστεί ο τύπος του HSV που προκάλεσε την λοίμωξη.

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

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

Για τον εντοπισμό της ορομετατροπής είναι απαραίτητη η συνδυασμένη ανάλυση των δειγμάτων. Το πρώτο δείγμα συλλέγεται αμέσως μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων, ενώ το δεύτερο μετά από 2-3 εβδομάδες. Αν το πρώτο δείγμα συλλεχθεί πολύ αργά, κατά την πορεία της λοίμωξης, η ορομετατροπή μπορεί να μην είναι δυνατόν να

ανιχνευθεί. Αν οι τιμές των συνδυασμένων ορών δεν δίνουν ένα τελικό αποτέλεσμα, τότε πρέπει να γίνει μία νέα ανάλυση των δειγμάτων.

Η διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ των ορών των τύπων 1 και 2 έχει τεκμηριωθεί. Ως εκ τούτου δεν αποκλείεται η απόκριση του 1 προς τον 2 και αντίστροφα.

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Δείγματα που περιέχουν δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες, όπως ο Ρευματοειδής Παράγοντας, η Χολερυθρίνη και τα Τριγλυκερίδια, δεν φάνηκαν να επηρεάζουν το τεστ. Σε κάποια περίπτωση εξακριβώθηκε παρεμβολή από τα αντισώματα IgM κατά του ιού του Epstein Barr και του Κυτταρομεγαλοϊού.

14. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Η διαγνωστική ευαισθησία του kit Enzywell Herpes Simplex 2 IgM δοκιμάστηκε σε 292 δείγματα εκ των οποίων τα 49 προήρχοντο από αρχείο διατηρημένων ορών, ενώ τα υπόλοιπα από αναλύσεις ρουτίνας του εργαστηρίου. Από τα 49 δείγματα από το αρχείο ορών, 17 περιείχαν αντισώματα IgM αντι-Herpes 1+2 και μεταξύ αυτών 7 δεν έδειχναν σημεία δραστηριότητας προς τον Απλό Έρπητα 2. Το γεγονός επιβεβαιώθηκε αναλύοντας τα ίδια δείγματα και με ένα εμπορικό kit, που βασιζόταν στην αρχή του ανταγωνισμού, και που ήταν ειδικό για τον ποιοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων αντι-Herpes Simplex 2.

Από τα δείγματα που αναλύθηκαν, 280 αποδείχθηκαν αρνητικά και 5 ψευδώς θετικά. Τα δεδομένα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

		ΑΝΑΦΟΡΑ	
		+	-
DIESSE	+	7	5
	-	0	280

Το kit Enzywell Herpes Simplex 2 IgM έδειξε διαγνωστική ευαισθησία 100% (I.C. al 95%: 64.6-100%) και διαγνωστική ειδικότητα 98.2% (I.C.al 95%: 96.0-99.3%).

15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Ακρίβεια κατά την ανάλυση

Cut Off n = 21	Παρτίδα 058	Παρτίδα 062	Παρτίδα 064
O.Π..	0.434	0.393	0.383
CV%	6	7,0	8,6

Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων

	Αριθμός παρτίδας								
	056		058		064				
Δείγμα	Ο.Π..	Δείγμα/Cut-off	Ο.Π..	Δείγμα/Cut-off	Ο.Π.	Δείγμα/Cut-off	Μ.Τιμή	S.D.	CV%
Θετ. Έλεγχ.	1.804	3.72	1.708	3.72	2.148	4.21	3.90	0.30	8
Cut off	0.485	1.00	0.459	1.00	0.51	1.00	1.00	0.00	0
Αρν. Έλεγχ.	0.102	0.21	0.095	0.21	0.043	0.08	0.20	0.08	18
HMM 1	0.416	0.86	0.306	0.67	0.384	0.75	0.80	0.10	16
HMM 2	0.813	1.68	0.794	1.73	0.687	1.35	1.60	0.20	24
HMM 3	1.812	3.74	1.742	3.80	2.036	3.99	3.8	0.13	24

16. ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

ΠΡΟΒΛΗΜΑ	ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ ΤΟΥ ΣΦΑΛΜΑΤΟΣ	ΤΙ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΚΑΝΕΤΕ
Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα αρνητικά)	Δεν προστέθηκαν ένα ή περισσότερα αντιδραστήρια ή προστέθηκαν σε λανθασμένη σειρά.	Ελέγξτε και πάλι την όλη διαδικασία. Ελέγξτε μήπως δεν έχει προστεθεί κάποιο αντιδραστήριο. Επαναλάβετε το τεστ.
	Το πλακίδιο δεν αντιδρά	Ελέγξτε 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). Επαναλάβετε 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**

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



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



INSTRUCCIONES DE USO

ENZYWELL HERPES SIMPLEX 2 IgM

REF 91025

(Español)

1. INDICACIONES

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

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

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

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

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

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba sobre la titulación IgM anti HSV tipo 2 está fundada sobre el principio de la captura de estas inmunoglobulinas y successiva revelación de las específicas, disfrutando de su capacidad de unir un antígeno conjugado a peroxidasa.

La captura se efectúa con anticuerpos monoclonales unidos en la fase sólida (pocillos de microtitulación). El antígeno está constituido por Herpes Simplex Virus tipo, purificado e inactivo, marcado con peroxidasa unida a monoclonales específicos anti-HSV tipo 2.

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 anticuerpos humanos monoclonales anti-IgM humanos

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

CONTROL + CONTROL POSITIVO 1x1.6 mL

Contenido: Suero humano diluido a concentración conocida de anticuerpos anti-HSV IgM tipo 2, en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

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

Contenido: Suero humano diluido a concentración conocida de anticuerpos anti-HSV IgM tipo 2, en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

Ag ANTÍGENO Polvo liofilizado x 6 frascos

Contenido: Herpes Simplex Virus tipo 2 purificado, en tampón fosfato conteniente líquido ascítico de ratón y lactosa.

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

CONJ CONJUGADO 1x18 mL

Contenido: anticuerpos monoclonales marcados anti-HSV tipo 2 con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol 0,05% Y Bronidox 0,02%.

Preparación: Listo para su uso

El inmunocomplejo se tiene que preparar acerca de 45 minutos adelante

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

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

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

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

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

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

Para la dilución de las muestras de suero.

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

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x 12 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Listo para su uso.

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H₂O₂ 0,01% estabilizados en tampón citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

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

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

CINTA ADHESIVA (2).

BOLSA DE PLÁSTICO (1).

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS.

- Incubador a 37°
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm e 405 nm, con linealidades hasta OD >= 2,000)
- Lavadora de Microplacas (no indispensable) para dispensar volúmenes entre 225-375 µl
- Agua Destilada u 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
ANTÍGENO RECONSTITUIDO	utilizar durante el día, no puede ser congelado
CONJUGADO	5 SEMANAS 2/8°C
SUBSTRATO	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C, 1 semana a 15/30°C en ambiente oscuro
DILUYENTE MUESTRAS	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C
WASH BUFFER	listo para su uso 2 semanas 2/8°C, 5 días 15/30 °C
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C

6. PRECAUCIONES DE USO

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

Cuidado:

Este kit contiene materiales de origen humano que han sido probados 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 infecto. Todos los materiales de origen humano tienen que manejarse según las prácticas comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.

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

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por vía oral. Usar los guantes de un solo uso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos a fondo después de terminar el test.
2. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
 - a) El tampón de lavado contiene detergentes
 - b) El conjugado contiene fenol
 - c) El sustrato es ácido
 - d) Los controles contienen ázida sódica (0.09%) que con plomo y cobre puede formar depósitos explosivos de metales 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 desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1,0%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1,0%, antes de que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada. Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta. Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C ó por encima de 39°C..** Abrir el envase con las tiras después 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 hidroc্লórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo..
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" ("efecto filo") que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador. Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO₂.
10. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
11. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación microbiana.
12. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.
13. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:

- instalación y requisitos específicos
- principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
- especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

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

Agitar con cuidado las muestras descongeladas antes de la titulación. La inactivación al calor puede dar resultados erróneos. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbica que conduce a resultados erróneos.

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

El test no se puede aplicar a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO

Método Manual

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el *Wash Buffer* 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Preparar el inmunocomplejo, 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 sustrato. Dispensar 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). El requisito mínimo indispensable es 1 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 (300 µL) cada ciclo. Añadir 100 µL de inmunocomplejo a cada pocillo (antígeno/anticuerpos monoclonales anti-HSV marcados con POD) e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo. Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante. Leer la Absorbancia (D.O.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST

Método Manual

- | | |
|--------|---|
| PASO 1 | Pipetear 100 µL de suero diluido/controles en los pocillos. |
| | - |
| | - |
| | Incubar 45 min. a 37°C |
| | - |
| | Lavar 4 veces (300 µL) |
| PASO 2 | Pipetear 100 µL de inmunocomplejo a cada pocillo |
| | - |
| | Incubar 45 min. a 37°C |
| | - |
| | Lavar 4 veces (300 µL) |
| | - |
| PASO 3 | Pipetear 100 µL de Substrato a cada pocillo |
| | - |
| | Incubar 15 min. a T.A. |
| | - |
| PASO 4 | Añadir 100 µL de Solución Bloqueante |
| | - |
| | Leer la D.O. a 450 nm dentro de 30 min |

10. VALIDACIÓN DEL TEST

Quitar el valor del blanco (<= 0.150) a todas las otras lecturas. Los valores en D.O. del suero de control Cut-off deben ser dentro del 25% del valor medio si testado en triple prueba. Descartar cualquier valor anormal y recalculer la media. El valor positivo debe tener D.O. igual por lo menos a 1.5 veces el Cut-off. La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser <=0.6. La D.O. del cut-off debe ser >= 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 IgM específicas para el antígeno.

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

La muestra se considera:

Inmune: si la concentración es > 1.2 .

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

No-inmune: si la concentración es < 0.8 .

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

No se puede excluir totalmente la reacción cruzada con las IgM anti-HSV 1 IgM. Para mejorar la especificidad se aconseja juntar los dos test para los tipos 1 y 3 adquiriendo también el cat. no. 91028. Comparando las D.O. obtenidas en los dos kit con el mismo suero se puede utilizar el criterio siguiente: se calculan los dos índices con respecto al cut-off y la relación entre el índice tipo 1 y el tipo 2. Para valores de relación inferiores a 0,7 distinguió como agente infeccioso el tipo 2; para valores superiores a 1,3 distinguió el tipo 1. Para valores intermedios resulta indeterminable el tipo de HSV que provocó la infección.

12. LIMITACIONES

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

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

Está documentada la reacción cruzada entre suerotipo 1 y 2, no se excluye por eso la respuesta del 1 hacia el 2 y vice versa.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Muestras con potenciales interferentes como Factor Reumatoide, Bilirubina y triglicéridos no parecían afectar el test. En algunos casos se verificó la interferencia desde anticuerpos IgM anti-Epstein Barr Virus e Cytomegalovirus.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

La sensibilidad diagnóstica del kit Enzywell Herpes Simplex 2 IgM se probó sobre 292 muestras de las cuales 49 pertenecientes a sujetos de la sueroteca, los demás procedentes de la rutina del laboratorio. De las 49 muestras de la sueroteca 17 contenían anticuerpos IgM anti-Herpes 1+2 y entre ellos, 10 no mostraban reactividad hacia el Herpes simplex suerotipo 2. El resultado se confirmó probando las mismas muestras con otro método comercial basado en el principio de la competición y específico para la determinación cualitativa de los anticuerpos anti-Herpes Simplex tipo 2. Entre las muestras restantes, 280 resultaban negativas y 5 falsas positivas. La tabla siguiente resume los resultados:

		REFERENCIA	
		+	-
DIESSE	+	7	5
	-	0	280

El kit Enzywell Herpes Simplex 2 IgM mostraba tener una sensibilidad diagnóstica del 100%(I.C. al 95%: 64.6-100%) y una especificidad diagnóstica del 98.2% (I.C. al 95%: 96.0-99.3%).

15. PRECISIÓN

Precisión intra-ensayo

Cut Off n = 21	Lote 058	Lote 062	Lote 064
D.O.	0.434	0.393	0.383
CV%	6	7,0	8,6

Precisión en pruebas

	Número lote								
	056		058		064				
Muestra	O.D.	Mues/Cut-off	O.D.	Mues/Cut-off	O.D.	Mues/Cut-off	Media	S.D.	CV%
Contr. Pos.	1.804	3.72	1.708	3.72	2.148	4.21	3.90	0.30	8
Cut off	0.485	1.00	0.459	1.00	0.51	1.00	1.00	0.00	0
Contr. Neg.	0.102	0.21	0.095	0.21	0.043	0.08	0.20	0.08	18
HMM 1	0.416	0.86	0.306	0.67	0.384	0.75	0.80	0.10	16
HMM 2	0.813	1.68	0.794	1.73	0.687	1.35	1.60	0.20	24
HMM 3	1.812	3.74	1.742	3.80	2.036	3.99	3.8	0.13	24

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

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

17. BIBLIOGRAFÍA

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

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



INSTRUCTIONS POUR L'EMPLOI

ENZYWELL

HERPES SIMPLEX 2 IgM

REF 91025

(Français)

1. UTILISATION

METHODE IMMUNOENZYMATIQUE A CAPTURE POUR LA DETERMINATION QUALITATIVE DES ANTICORPS IgM ANTI-HERPES SIMPLEX VIRUS (TYPE 2) DANS LE SERUM HUMAIN.

2. INTERET CLINIQUE

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

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

3. PRINCIPE

Le test pour le dosage des IgM anti-HSV-2 est basé sur le principe de la capture de ces immunoglobulines et leur détermination, en exploitant leur capacité de lier un antigène conjugué à la peroxydase. La capture se réalise en utilisant des anticorps monoclonaux liés à la phase solide (puits sur la plaque). L'antigène se constitue de l'HSV du type 2 purifié, inactif et marqué avec la peroxydase liée aux anticorps monoclonaux spécifiques anti-HSV-2.

4. CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS

- Le kit permet de réaliser 96 réactions.

Porter les réactifs à température ambiante avant de les utiliser.

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

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

CONTROL + CONTROLE POSITIF 1 x 1.6 mL

Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgM anti-HSV-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 dépend du titre en anticorps.

CONTROL CUT-OFF CONTROLE SEUIL 1 x 2.5 mL

Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgM anti-HSV-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 dépend du titre en anticorps.

Ag ANTIGENE lyophilisé, x 6 flacons.

Composition : Herpes Simplex Virus TYPE 2 purifié, en tampon phosphate contenant du liquide ascitique de souris et du lactose.

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

CONJ CONJUGUE 1x18 mL

Composition : Anticorps monoclonaux anti-HSV-2 marqués à la peroxydase, dans un tampon phosphate contenant 0.05 % de phénol et 0.02 % de bronidox..

Préparation : Prêt à l'emploi. L'immunocomplexe doit être préparé 45 minutes avant l'emploi.

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

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

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

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

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

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

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

Pour diluer les échantillons de sérum.

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

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1 x 12 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Prêt à l'emploi.

Composition : Tétraméthylbenzidine (à 0.26 mg/ml) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ à 0.01 %) stabilisé dans un tampon citrate (à 0.05 mol/l). pH = 3.8.

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

Composition : H₂SO₄ (à 0.3 mol/l) en solution prête à l'emploi.

SACHET EN POLYETHYLENE (1)

FEUILLES ADHESIVES (2)

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Incubateur à 37 °C
- Lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 ou 450/620 nm, 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...)
- Micropipettes 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'ouverture 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.
ANTIGENE RECONSTITUE	Il doit être utilisé dans la journée et ne peut pas être congelé.
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 échantillons de serum et les réactifs usages doivent être traités come des déchets infectés, et donc éliminés conformément aux dispositions de loi en vigueur.

PRECAUTIONS 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 dans le bain-marie. Autrement, on peut faire incuber les plaques dans un analyseur approprié. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO₂.

10. Avant de lire la microplaque, veiller à ce que le fond de la microplaque soit propre et sec et qu'il n'y ait aucune bulle d'air à la surface du liquide.
11. 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. ECHANTILLONS

Les sérums frais ou décongelés peuvent être utilisés. Les échantillons peuvent être stockés à +2...+8 °C pendant 4 jours.

Pour un stockage plus long, congeler les sérums à – 20 °C. Peut subir jusqu'à un maximum de trois décongelations. Éviter l'utilisation de l'espace de congélateur à dégivrage automatique pour le stockage des échantillons. Les sérums décongelés doivent être bien agités avant l'utilisation. La non-activation à la chaleur peut provoquer des résultats erronés.

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

L'échantillon ne peut pas se constituer de plasma humain.

8. PROCEDURE

Préparation :

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

Exécution

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

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

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

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

9. SCHEMA D'ANALYSE

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

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.

Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl)

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

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.

Laver pendant 30 seconde à 4 reprises (300 µL)

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

Incuber pendant 15 minutes à la température ambiante.

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

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

10. VALIDATION DU TEST

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

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

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

Le rapport des D.O du contrôle négatif et du sérum seuil doit être $\leq 0,6$. La D.O. du contrôle seuil doit être ≥ 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'IgM spécifiques contre l'HSV-2.

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

L'échantillon est considéré comme étant :

Positif : si le rapport est > 1.2

Incertain : si le rapport est compris 0.8 et 1.2

Négatif : si le rapport est $> 0,8$

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

La réaction croisée avec les IgM anti-HSV-1 ne peut pas être complètement exclue. Pour améliorer la spécificité, il est conseillé d'effectuer les deux tests pour les types 1 et 2, en utilisant le kit HSV 1 IgM (code 91028). Il est possible d'utiliser le critère suivant en comparant les D.O. de l'échantillon obtenues avec les deux méthodes : Calculer les deux indices en fonction du contrôle seuil et le rapport entre les indices du type 1 et du type 2. Si la valeur du rapport est inférieure à 0.7, l'agent infectant est du type 2 ; si la valeur est supérieure à 1.3 l'agent est du type 1. En cas de valeurs intermédiaires, le type de l'HSV qui a provoqué l'infection ne peut pas être déterminé.

12. LIMITES DE LA METHODE

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

La réaction croisée avec les IgM anti-HSV-2 a été démontrée et ne peut donc pas être complètement exclue.

13. SPECIFICITE ANALYTIQUE

Des substances potentiellement interférentes comme le Facteur Rhumatoïde, la bilirubine et les triglycérides ne faussent pas les résultats. L'interférence des anticorps IgM vers l'Epstein Barr et le Cytomégalo virus a été démontrée quelquefois.

14. SPECIFICITE ET SENSIBILITE DIAGNOSTIQUE

La sensibilité et la spécificité diagnostiques ont été étudiées sur 292 sérums, dont 49 provenaient de la sérothèque et les autres de la routine du laboratoire. Sur ces 49 sérums, 17 échantillons contenaient des anticorps anti-Herpes 1+2 IgM et 10 d'entre ceux-ci ne présentaient pas de réactivité vers le sérotype 2. Ce résultat a été confirmé en dosant les mêmes sérums avec une autre méthode disponible dans le commerce et basée sur le principe de la "compétition" et spécifique pour la détermination qualitative des anticorps anti-Herpes Simplex type 2.

Sur les sérums restants, 280 étaient négatifs et 5 faux-positifs. Le tableau montre les résultats.

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	7	5
	-	0	280

Le kit Enzywell Herpes Simplex 2 IgM présente une sensibilité diagnostique de 100 % (I.C. à 95 % : 64.6 – 100 %) et une spécificité diagnostique de 98.2 % (I.C. à 95 % : 96.0 – 99.3 %).

15. PRECISION

Précision dans la série :

Cut Off n = 21	Lot 058	Lot 062	Lot 064
O.D.	0.434	0.393	0.383
CV %	6	7,0	8,6

Précision entre séries :

	Lot								
	056		058		064				
Echantillon	O.D.	Echant./Seuil	O.D.	Echant./Seuil	O.D.	Echant./Seuil	Moyen	S.D.	CV%
Contrôle Pos.	1.804	3.72	1.708	3.72	2.148	4.21	3.90	0.30	8
Seuil	0.485	1.00	0.459	1.00	0.51	1.00	1.00	0.00	0
Contrôle Nég.	0.102	0.21	0.095	0.21	0.043	0.08	0.20	0.08	18
HMM 1	0.416	0.86	0.306	0.67	0.384	0.75	0.80	0.10	16
HMM 2	0.813	1.68	0.794	1.73	0.687	1.35	1.60	0.20	24
HMM 3	1.812	3.74	1.742	3.80	2.036	3.99	3.8	0.13	24

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

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

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



INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ENZYWELL HERPES SIMPLEX 2 IgM

REF 91025

(Português)

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

MÉTODO DE CAPTURA MONO-ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE ANTICORPOS DE CLASSE IgM 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 noutras locais anatómicos. O HSV também pode provocar uma forma de queratite ocular, e lesões no sistema nervoso central.

O HSV pode afectar praticamente toda a população. A infecção primária é frequentemente de forma subclínica e é raramente diagnosticada. Após um período de incubação de duração variável, a reactivação pode ocorrer e a replicação pode levar ou não a lesões clínicas. A infecção contraída durante o parto é de interesse particular, sendo uma causa importante de morbilidade e mortalidade.

É por isso importante determinar o estado imunitário das mulheres durante a gravidez para detectar a seroconversão. O ensaio de IgM específico é importante para o diagnóstico de infecção neonatal e encefalite provocadas por HSV. Além disto, a presença de IgM específico demonstra actividade viral em progresso, apesar de não ser possível distinguir entre infecções primárias e reactivações.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O teste para ensaio de IgM HSV é baseado no princípio da captura destas imunoglobulinas e a subsequente identificação das que são específicas, fazendo uso da habilidade para ligar um antígeno conjugado à peroxidase.

A captura é efectuada usando anticorpos monoclonais ligados à fase sólida (poços de microtitulação). O antígeno é composto de Herpes simplex Vírus tipo 2 purificados, inactivados e marcados com peroxidase conjugada a anticorpos monoclonais anti-HSV (tipo 2).

4. CONTEÚDO DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE

- Os reagentes são suficientes para 96 determinações.

Ponha à temperatura ambiente antes da utilização.

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

Utilização: Abra a embalagem no lado oposto do código (M mais o número do lote), 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 IgM 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 2.5 mL

Conteúdo: Soro humano que contém anticorpos IgM 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.

Ag ANTIGÉNIO Pó seco-congelado x 6 frascos

Conteúdo: Vírus purificado de Herpes simplex (tipo 2), numa tampão fosfatado com fluido ascítico de rato e lactose.

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

CONJ CONJUGADO 1 x 18 mL

Conteúdo: anticorpos monoclonais anti-HSV (tipo 2) marcados com peroxidase, numa solução tampão fosfatada contendo fenol 0.05% e Bronidox 0.02%.

Preparação: Prontos a usar.

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

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

Conteúdo: 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 37°C 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 H₂O₂ 0.01% estabilizado num tampão de citrato a 0.05 mol/L (pH 3.8).

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

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

PELÍCULAS ADESIVAS (2)

SACO DE POLIETILENO (1)

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Incubador a 37°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
ANTIGÉNIO RECONSTITUÍDO	deve ser usado no mesmo dia, não pode ser congelado
CONJUGADO	5 semanas a 2/8°C
SUBSTRATO	até à data de validade a 2/8°C, 1 semana a 15-30°C, guarde ao abrigo da luz
DILUENTE DE AMOSTRAS	até à data de validade a 2/8°C
TAMPÃO DE LAVAGEM	(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. MANTER A 2-8°C.

Cuidado!

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 substrato 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 hidrolórico 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 35°C nem acima de 39°C.**
Abra o envelope que contém as tiras após cerca de 30 minutos à temperatura ambiente, no mínimo.
2. Não utilize reagentes além da data de validade anunciada. Contaminação microbiológica de reagentes deve ser evitada, dado que poderá reduzir a duração do produto e provocar resultados errados.
3. Não modifique o procedimento de teste ou substitua reagentes por outros de outros fabricantes ou outros lotes de reagente a menos que sejam estipulados como intermutáveis. Não reduza nenhum dos tempos recomendados para incubação.
4. Qualquer recipiente de vidro a ser usado com os reagentes deve ser lavado profusamente com ácido hidrolórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada.
5. Não exponha reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.
6. Não deixe que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.
7. Deve-se ter cuidado para não haver contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com os vários reagentes.
8. Deve ser tomado cuidado para evitar tocar ou salpicar a borda do poço com o conjugado. Não “assopre” as microplacas.
9. Os ensaios de imuno-enzimas podem exibir ocasionalmente um “efeito de margem” que deve ser minimizado aumentando a humidade durante os passos de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas a 37°C tanto num banho de água com suporte flutuante ou para rack para suportar as placas se for

necessário, ou num incubador. Alternativamente, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Veja o manual de instruções apropriado para mais detalhes. Os incubadores de CO₂ não devem ser utilizados.

10. Assegure-se que a parte inferior da placa está limpa e seca, e que nenhuma bolha estão presentes na superfície do líquido antes de a ler.
11. A utilização de amostras altamente 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 H₂O).
- Prepare o imunocomplexo reconstituindo o produto seco (antigénio) e congelado com o conjugado (volume relatado na etiqueta).

Amostras diluídas 1:101 distribuindo 10 µL de soro em 1mL de diluente. Deixe um poço para o branco, executando com a utilização de 100 µL de mistura de substrato. Coloque 100 µL de cada amostra diluída por poço (testes duplicados são recomendados). Coloque controles (NÃO DILUÍDOS) numa tira (100 µL em cada poço). 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 imunocomplexo (Antigénio/anticorpos monoclonais anti-HSV marcados com HRP) a cada poço e deixe incubar mais uma vez durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com filme protector. A placa é lavada mais 4 vezes, como está descrito acima. Finalmente, o substrato é distribuído (100 µL/poço). Após 15 minutos à temperatura ambiente, a reacção enzimática é parada com 100 µL de solução de paragem. A adsorância (D.O.) é lida a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE
--

Técnica manual

PASSO 1 Coloque 100 µL de amostra diluída/controles nos poços das tiras

- Incube durante 45 minutos a 37°C
- Lave 4 vezes (300 µl)

PASSO 2 Junte 100 µL de imunocomplexo a cada poço

- Incube durante 45 minutos a 37°C
- Lave 4 vezes (300 µl)

PASSO 3 Junte 100 µL de substrato a cada poço

- Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente

PASSO 4 Adicione 100 µL de solução de paragem.

Leia a adsorção a 450 nm dentro de 30 min.

10. VALIDAÇÃO DO TESTE

Subtraia o valor do nulo (≤ 0.150) de todas as outras leituras. Os valores D.O. do soro de controlo 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 IgM 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: $\pm 20\%$ 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.

A possibilidade de reacções cruzadas com o anti-HSV 1 não podem ser completamente excluídas. Para melhorar a especificidade é recomendado que se execute o teste para ambos os tipos 1 e 2, usando o produto com a referencia 91028. Comparando as DO obtidas na mesma amostra com os dois kits, podemos adoptar o seguinte critério: Os dois índices são calculados comparando o cut-off e o ratio entre o índice para o tipo 1 e o índice para o tipo 2. Quando o ratio for inferior a 0.7, o agente infectante é o tipo 2; quando o valor é superior a 1.3, o agente infectante é o tipo 1. Em casos de valores intermédios, não é possível determinar qual o tipo de HSV que está a causar a infecção.

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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

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

Reacções cruzadas entre serotipos 1 e 2 foram documentadas e não podem ser excluídas.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Substancias potencialmente interferentes tais como o Factor Reumatóide, bilirubinas e triglicéridos parecem não influenciar ou interferir no teste. Em alguns casos a interferencia de anticorpos IgM contra o Epstein Barr e Citomegalovirus foi demonstrada.

14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

A sensibilidade e a especificidade do kit Enzywell Herpes Simplex 2 IgM foram estudadas em 292 amostras, 49 das quais provenientes de serotecas de soros e as restantes de rotina. Nestas amostras, 17 continham Herpes 1+2 IgM e 10 não mostravam qualquer reactividade contra o serotipo 2 do Herpes simplex. Este resultado foi confirmado testando as amostras num kit comercial baseado na reacção de competição e específico para a determinação qualitativa dos anticorpos Herpes simplex tipo 2.

As restantes 280 amostras foram negativas e 5 falsos positivos. A tabela sumariza os resultados.

		MÉTODO DE REFERÊNCIA	
		+	-
DIESSE	+	7	5
	-	0	280

O kit Enzywell Herpes simplex 2 IgM tem uma sensibilidade diagnóstica de 100% (CI_{95%}: 64.6-100%) e uma especificidade diagnóstica de 98.2% (CI_{95%}: 96.0-99.3%).

15. PRECISÃO**Precisão no teste**

Cut Off n = 21	Lote 058	Lote 062	Lote 064
D.O.	0.434	0.393	0.383
CV%	6.0	7.0	8.6

Precisão entre testes

	Lote						Média	S.D.	CV%
	056		058		064				
	D.O.	Amostra/ Cut-Off	D.O.	Amostra/ Cut-Off	D.O.	Amostra/ Cut-Off			
Amostra	D.O.	Amostra/ Cut-Off	D.O.	Amostra/ Cut-Off	D.O.	Amostra/ Cut-Off	Média	S.D.	CV%
Contr. Pos.	1.804	3.72	1.708	3.72	2.148	4.21	3.90	0.30	8
Cut off	0.485	1.00	0.459	1.00	0.51	1.00	1.00	0.00	0
Contr. Neg.	0.102	0.21	0.095	0.21	0.043	0.08	0.20	0.08	18
HMM 1	0.416	0.86	0.306	0.67	0.384	0.75	0.80	0.10	16
HMM 2	0.813	1.68	0.794	1.73	0.687	1.35	1.60	0.20	24
HMM 3	1.812	3.74	1.742	3.80	2.036	3.99	3.8	0.13	24

16. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

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

17. REFERÊNCIAS

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

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

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



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