ENZY-WELL

HERPES SIMPLEX 1 IgG RECOMBINANT

REF 91023
(96 tests)

REF 91182
(960 tests)

Prodotto da/
Manufactured by:

DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Strada dei Laghi, 39
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy

	Capitolo Section
Modifiche introdotte nella revisione corrente **Changes introduced in the current revision**	**10 – 11 – 16**

CE

DIESSE

ISTRUZIONI PER L'USO

ENZY-WELL
HERPES SIMPLEX 1 IgG RECOMBINANT

Per la determinazione qualitativa degli anticorpi IgG anti-Herpes Simplex Virus (tipo 1)

Solo per uso diagnostico in vitro

1. UTILIZZAZIONE

Kit immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi IgG anti-Herpes Simplex Virus (tipo 1) nel siero umano.

2. INTRODUZIONE

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

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

Può essere perciò importante la valutazione dello stato immunitario della donna durante la gravidanza al fine di rilevare una eventuale sieroconversione. Il dosaggio delle IgG specifiche è importante per definire lo stato sierologico del paziente.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). L'antigene viene legato alla fase solida. Le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene in seguito ad incubazione con siero umano diluito. Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti-IgG umane coniugati con perossidasi di rafano. Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi. Il colore blu che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame. Quando la reazione enzimatica è interrotta per aggiunta di una soluzione di acido solforico, la colorazione diventa gialla. Il colore, proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel siero, può essere letto in un lettore per micropiastre.

4. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

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

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

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca.
2. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova.
3. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
4. 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.
5. Le apparecchiature non monouso devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1 h a 121°C; le apparecchiature monouso devono essere autoclavati o inceneriti.
6. L'acido solforico contenuto nello Stop Solution e l'acido cloridrico 2M 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.
7. 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.
8. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere decontaminato, 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

decontaminare eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. La D.O. del calibratore, dei controlli e dei campioni può essere leggermente diversa fra piastre diverse. Quindi, se si utilizzano nella stessa seduta delle strips da piastre diverse, anche se dello stesso lotto, è necessario ripetere la determinazione del calibratore.
2. 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.**
3. Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente
4. 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.
5. 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.
6. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
7. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
8. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
9. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni.
10. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. È importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso con il substrato e con il coniugato.
11. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato.
12. Non soffiare sulle micropiastre.
13. I dosaggi immuno-enzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO_2.
14. 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.
15. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, o campioni che presentano inquinamento microbico.
16. Evitare la contaminazione dei pozzetti con la polvere da guanti monouso.
17. L'utilizzo del kit con strumenti automatici deve essere validato da parte dell'utilizzatore.
18. 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.

5. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni
I reagenti sono sufficienti per 960 determinazioni

Portare i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso.

MT PLATE MICROPIASTRA (PF93021)
12x8 (REF 91023)
10x96 (REF 91182)
Contenuto: piastra da 96 pozzetti sensibilizzati con antigene HSV 1 IgG ricombinante, costituito dalla glicoproteina G1 ricombinante specifica per Herpes Simplex Virus Tipo 1.
Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta del codice (H1R seguito dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto e le strips necessarie. Riporre le altre non utilizzate nella busta di polietilene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

CONJ CONIUGATO (PF93523)
1x16mL (REF 91023)
8x16 mL (REF 91182)
Contenuto: anticorpi monoclonali anti-IgG marcati con perossidasi in tampone fosfato con fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%. Liquido, pronto all'uso.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO (PF93823)
1x1.6 mL (REF 91023)
4x1.6 mL (REF 91182)
Contenuto: Siero umano a concentrazione nota di anticorpi IgG anti-HSV 1, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e Sodio Azide 0.09%. Liquido, pronto all'uso.

CONTROL IgG - IgG CONTROLLO NEGATIVO (PF93910)
1x1.6 mL (REF 91023)
4x1.6 mL (REF 91182)
INTERCAMBIABILE FRA LOTTI
Contenuto: Siero umano, non contenente anticorpi anti-HSV 1 IgG, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e Sodio Azide 0.09%. Liquido, pronto all'uso.

CONTROL CUT-OFF CONTROLLO CUT-OFF (PF91823)
1x2 mL (REF 91023)
5x2mL (REF 91182)

Contenuto: Siero umano a concentrazione nota di anticorpi IgG anti-HSV 1, diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e Sodio Azide 0.09%. Liquido, pronto all'uso.

SAMP DIL 3 DILUENTE 3 (PF30029)
1x100 mL (REF 91023)
6x100 mL (REF 91182)
INTERCAMBIABILE FRA LOTTI
Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con Sodio Azide 0.09% e colorante (metilarancio), contenente estratti cellulari.
Uso: Da utilizzare per la diluizione dei campioni. Liquido, pronto all'uso.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10x (PF93603)
1x100 mL (REF 91023)
5x100 mL (REF 91182)
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 o deionizzata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, disciogliерli a 37°C prima di diluire.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619)
1x12 mL (REF 91023)
1x120 mL (REF 91182)
INTERCAMBIABILE FRA LOTTI
Contenuto: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL e H_2O_2 0.01% stabilizzati in tampone citrato 0.05 mol/L (pH 3.8). Liquido, pronto all'uso.

H_2SO_4 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602)
1x16 mL (REF 91023)
1x120 mL (REF 91182)
INTERCAMBIABILE FRA LOTTI
Contenuto: Soluzione di H_2SO_4 0.3 mol/L. Liquido, pronto all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).
BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO.

- Incubatore a 37-40 °C
- Lettore di micro piastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm, con linearità fino ad OD ≥ 2.000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi compresi tra 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µl di soluzione
- Guanti monouso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

6. 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:

MICROPIASTRA	8 settimane a 2-8°C in busta di polietilene
CONTROLLO CUT-OFF	8 settimane a 2-8°C
CONTROLLO POSITIVO	8 settimane a 2-8°C
CONTROLLO IgG NEGATIVO	8 settimane a 2-8°C
CONIUGATO	8 settimane a 2-8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2-8°C; 1 settimana a 15-30°C; conservare al buio
DILUENTE 3	fino alla scadenza a 2-8°C
TAMPONE DI LAVAGGIO	2 settimane a 2-8°C; 5 giorni a 15-30°C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2-8°C

7. TIPO DI CAMPIONI E CONSERVAZIONE
Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C; per periodi di conservazione maggiori, congelare a –20°C. Il campione può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. Dopo scongelamento agitare con cura il campione prima del dosaggio. L'inattivazione al calore può fornire risultati erronei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erronei.

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

Il test non è applicabile al plasma umano.

8. PROCEDIMENTO
PREPARAZIONE
Prima dell'inizio del test, portare tutti i reagenti ed i campioni in esame a temperatura ambiente (18-30°C).

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Diluire i campioni 1:51 dispensando 10 µL di siero in 0.5 mL di diluente.

ESECUZIONE DEL TEST

1. Distribuzione dei campioni: Dispensare 100 µl di campione diluito per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato) o 100 µl di controllo (positivo, negativo o cut-off). Il requisito minimo indispensabile è di 1 controllo negativo, 1 controllo positivo e 2 controlli Cut-Off. Lasciare un pozzetto della strip per il bianco (100 µL di substrato).
2. Incubazione: Incubare la piastra coperta con foglio adesivo a 37°C per 45 minuti.
3. Lavaggio: Rimuovere il foglio adesivo, aspirare il contenuto di tutti i pozzetti e lavare 4 volte riempiendo ciascun pozzetto con 300 µL di soluzione di lavaggio. Attendere 30 secondi prima di ogni lavaggio.
4. Distribuzione del coniugato: Dispensare 100 µL di coniugato per ciascun pozzetto della piastra.
5. Incubazione del coniugato: Incubare la piastra coperta con foglio adesivo a 37°C per 45 minuti.
6. Lavaggio: Rimuovere il foglio adesivo, aspirare il contenuto di tutti i pozzetti e lavare 4 volte riempiendo ciascun pozzetto con 300 µL di soluzione di lavaggio. Attendere 30 secondi prima di ogni lavaggio.
7. Distribuzione del substrato: Dispensare 100 µL di substrato per ciascun pozzetto della piastra.
8. Incubazione del substrato: Incubare la piastra a temperatura ambiente per 15 minuti.
9. Arresto della reazione: Dispensare 100 µL di soluzione bloccante seguendo lo stesso ordine di aggiunta del punto 4.
10. Lettura: Leggere le D.O. a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min. Rileggere a 405 nm se ci sono D.O. superiori a 2.000.

9. SCHEMA DEL SAGGIO PER HERPES SIMPLEX 1 IgG RECOMBINANT

STEP 1	Mettere 100 µL di siero diluito/controlli (positivo, negativo e cut-off) nei pozzetti dello strip. Agitare.
	-
	Incubare 45 min. a 37°C
	-
	Lavare 4 volte (300 µL)
	-
STEP 2	Mettere 100 µL di coniugato per pozzetto
	-
	Incubare 45 min. a 37°C
	-
	Lavare 4 volte (300 µL)
	-
STEP 3	Mettere 100 µL di Substrato per pozzetto
	-
	Incubare 15 min. a t.a.
	-
STEP 4	Aggiungere 100 µL di Stop Solution
	-
	Leggere la D.O. a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Controllo negativo: Il rapporto tra la D.O. del controllo negativo e la D.O. del cut-off deve essere < 0.6.
Controllo positivo: il controllo positivo deve avere una D.O. di almeno 1.5 volte quella del siero cut-off
Controllo cut-off: la D.O. del cut-off deve essere > 0.2.

Se uno dei risultati dei sieri di controllo non rientra nell'intervallo di accettabilità, ripetere il test. Se il problema persiste contattare il Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

POSITIVO: quando l'Index è > 1.2
DUBBIO: per tutti i valori 0.8-1.2
NEGATIVO: quando l'Index è < 0.8.

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

12. LIMITAZIONI

Sieri prelevati durante la fase acuta dell'infezione, quando sono presenti solamente anticorpi della classe IgM, potrebbero risultare negativi con questa tecnica.
Il livello delle IgM anti-Herpes Simplex Virus dovrebbe essere determinato usando il kit Enzy-Well Herpes Simplex Virus IgM. Alternativamente, si analizzerà un secondo campione prelevato 8-14 giorni più tardi, per verificare se vi sia stato un aumento delle IgG.
Tutti i risultati positivi necessitano di una attenta interpretazione.
Il test non può essere utilizzato da solo per una diagnosi clinica. Un risultato negativo non preclude la eventualità di malattia.
Il risultato del test deve essere valutato insieme a dati provenienti dall'anamnesi del paziente e/o da altre indagini diagnostiche.

13. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

I valori attesi nella popolazione normale, determinati esaminando 120 sieri di donatori sani, erano compresi fra 0.2 e 0.8 Index.

14. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 5 campioni (2 Negativi, 1 a Cut-Off e 2 Positivi) ai quali sono stati aggiunti i seguenti interferenti:

Fattore Reumatoide (44 – 220 UI/ml)
Bilirubina (4.5 mg/dl – 45 mg/dl)
Trigliceridi (10 mg/dl – 250 mg/dl)
Emoglobina (5 mg/ml – 30 mg/ml)

La presenza nel siero in esame di sostanze interferenti sopra riportate non altera il risultato del test.

15. CROSS-REATTIVI

66 campioni, positivi a Rubella, Epstein-Barr Virus, Varicella, Cytomegalovirus, HSV 2 and Toxoplasma sono stati testati. Non sono state rilevate reazioni crociate significative.

16. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione sono stati analizzati 258 campioni con il kit Diesse e con un altro metodo commerciale.
I risultati sono riportati nella tabella seguente:

		Riferimento		
		+	-	Totale
Diesse	+	183	1	184
	-	2	72	74
	Totale	185	73	258

Percent Positive Agreement (~Sensibilità Diagnostica):
98.9% $CI_{95\%}$: 96.1-99.7
Percent Negative Agreement: (~Specificità Diagnostica):
98.6% $CI_{95\%}$: 92.6-99.7

17. PRECISIONE

Campione	All'interno della seduta		Tra sedute		Tra lotti	
	Media (Index)	CV%	Media (Index)	CV%	Media (Index)	CV%
1	0.3	5.8	0.4	12.5	0.4	15.0
2	0.5	5.3	0.7	10.0	0.6	10.0
3	0.6	8.7	0.8	8.8	0.7	8.6
4	0.7	8.0	0.8	6.3	0.8	-
5	0.9	2.8	1.1	7.3	1.1	-
6	2.7	6.5	3.0	12.3	2.7	7.4
7	3.8	6.6	4.6	7.2	4.4	3.4
8	5.2	5.5	7.2	8.9	6.6	6.1
9	8.2	3.1	10.3	10.2	9.6	5.4
10	11.0	1.8	12.0	7.8	11.8	2.2

18. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBLI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi istruzioni per l'uso).
		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
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

19. BIBLIOGRAFIA

1. Arvaja M., Lehtinen M., Koskela P., Lappalainen M., Paavonen J., Vesikari T.; "Serological evaluation of Herpes Simplex Virus type 1 and type 2 infections in pregnancy"; Sexual Transmission Infections , 1999; 75: 168–171
2. Ashley R.L. et al.; "Genital herpes: review of the epidemic and potential use of type-specific serology"; Clinical of Microbiology Review, 1999; 12: 1-8
3. Ashley R.L., et al.; "Comparison of Western blot (immunoblot) and glycoprotein G-specific immunoblot assay for detecting antibodies to Herpes Simplex Virus type 1 and 2 in human sera"; Journal of Clinical Microbiology, 1988; 26: 662-667
4. Ashley R.L., Wu L., Pickering J.W., Tu M.C., Schonorenberg L; " Premarket evaluation of commercial glycoprotein G-based enzyme immunoassay for Herpes Simplex Virus type-specific antibodies"; Journal of Clinical Microbiology, 1998; 36: 294-295
5. Hashido M., Lee F. K., Inouye S., Kawana T.; "Detection of Herpes Simplex Virus type-specific antibodies by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay based on Glycoprotein G"; Journal of Medical Virology, 1997; 53: 319-323
6. Whittington W.L., Celum C.L., Cent A., Ashley R.L.; "Use of a glycoprotein G-based type-specific assay to detect antibodies to Herpes Simplex Virus type 2 among persons attending sexually transmitted disease clinics"; Sexual Transmission Diseases, 2001; 28: 99-104

20. SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI

	Data di fabbricazione
	Utilizzare entro
	Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso
	Fabbricante
	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Limiti di temperatura
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Rischio biologico
REF	Numero di catalogo
IVD	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
LOT	Codice del lotto

Prodotto da
DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy

CE

DIESSE

INSTRUCTIONS FOR USE

ENZY-WELL
HERPES SIMPLEX 1 IgG RECOMBINANT

For the qualitative determination of IgG-class antibodies to Herpes Simplex Virus (type 1)

For In Vitro Diagnostic Use Only

1. INTENDED USE

Immunoenzymatic kit for the qualitative determination of IgG-class antibodies to Herpes Simplex Virus (type 1) in human serum.

2. INTRODUCTION

The Herpes simplex virus (HSV) is a member of the Herpesviridae family, of which two types are known: type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) which present slight antigenic differences. HSV-1 causes chiefly oral-facial lesions, while HSV-2 is mainly responsible for genital lesions, but this distinction is not binding, both types occasionally causing infection in either anatomical site. HSV may also cause a form of ocular cheratitis, and lesions of the central nervous system.
HSV can affect practically the whole population. The primary infection is often in a subclinical form and is rarely diagnosed. After a latency period of variable duration, reactivation may occur and viral replication may or may not give rise to clinical lesions. Infection contracted during birth is of particular interest, this being an important cause of morbidity and mortality. It is therefore important to determine the immunitary state of women during pregnancy in order to detect serum conversion. The assay of specific IgG is important to establish the serological state of the patient.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).
The antigen is bound to the solid phase. The specific immunoglobulins are bound to the antigen through incubation with dilute human serum. After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate, composed of human IgG monoclonal antibodies conjugated to horseradish peroxidase. The unbound conjugate is eliminated, and the peroxidase substrate added. The blue color which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample. When the enzymatic reaction is interrupted by the addition of a sulphuric acid solution, the yellow color which develops can be easily read using an ELISA microplate reader.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

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

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

Health and Safety Information

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

   If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
5. 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.
6. Sulphuric acid required for the Stop Solution and 2 M 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.
7. 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.
8. 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. The OD of calibrator, controls and samples can be slightly different among different plates. For such reason if during the same run strips from different plates are used, even if the lot is the same, it is necessary to repeat the determination of the calibrator.
2. 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.**
3. Open the package containing the strips after 30 minutes at room temperature at least.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
8. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
9. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers.
10. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the substrate and conjugate.
11. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate.
12. Do not "blow-out" from microplates.
13. 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.
14. 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.
15. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
16. Care should be taken to avoid contaminating the microplate wells with disposable gloves powder.
17. The use of the kit with automated equipment has to be validated by the user.
18. 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

5. KIT COMPOSITION AND REAGENT PREPARATION

Reagents are sufficient for 96 determinations.
Reagents are sufficient for 960 determinations.

Bring to room temperature before use.

MT PLATE MICROPLATE (PF93021)
12x8 (REF 91023)
10x96 (REF 91182)
Content: microplate (96 wells) coated with HSV 1 IgG recombinant antigen, composed of recombinant G1 glycoprotein specific for Herpes Simplex Virus Type 1.
Use: open the package at the opposite end from the code (H1R followed by the lot number) which is useful for identification purposes, remove the support and strips required for the assay 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.

CONJ CONJUGATE (PF93523)
1x16mL (REF 91023)
8x16 mL (REF 91182)
Content: anti-IgG monoclonal antibodies, labeled with peroxidase, in phosphate buffer containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%. Liquid, ready for use.

CONTROL + POSITIVE CONTROL (PF93823)
1x1.6 mL (REF 91023)
4x1.6 mL (REF 91182)
Content: Human serum, containing a known concentration of anti-HSV 1 IgG antibodies, diluted in phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%. Liquid, ready for use.

CONTROL IgG - IgG NEGATIVE CONTROL (PF93910)
1x 1.6 mL (REF 91023)
4x1.6 mL (REF 91182)
INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS
Content: Human serum, not containing anti-HSV 1 IgG antibodies, diluted in phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%. Liquid, ready for use.

CONTROL CUT-OFF CUT OFF CONTROL (PF91823)
1x2 mL (REF 91023)
5x2mL (REF 91182)
Content: Human serum, containing a known concentration of anti-HSV 1 IgG antibodies, diluted in phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%. Liquid, ready for use.

SAMP DIL 3 DILUENT 3 (PF30029)
1x100 mL (REF 91023)
6x100 mL (REF 91182)
INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS
Content: Proteic solution in phosphate buffer with sodium azide 0.09% containing methyl orange as dye and cells extracts.
Use: To be used to dilute samples. Liquid, ready for use.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X (PF93603)
1x100 mL (REF 91023)
5x100 mL (REF 91182)
INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS
Content: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5%.
Preparation: dilute the required volume 1:10 with distilled or deionized water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619)
1x12 mL (REF 91023)
1x120 mL (REF 91182)
INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS
Content: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and H_2O_2 0.01% stabilized in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8). Liquid, ready for use.

H_2SO_4 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602)
1x16 mL (REF 91023)
1x120 mL (REF 91182)
INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS
Content: H_2SO_4 0.3 mol/L. Liquid, ready for use.

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

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED
- Incubator at 37-40 °C
- Microplate reader (wave length 450 or 450/620 nm, with linearity up to OD ≥ 2.000)
- Microplate washer (optional) able to dispense volumes in the range 225-375 µl
- Distilled or deionized water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl of solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue

6. 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:

MICROPLATE	8 weeks a 2-8°C in polyethylene bag
CUT-OFF CONTROL	8 weeks at 2-8°C
POSITIVE CONTROL	8 weeks at 2-8°C
IgG NEGATIVE CONTROL	8 weeks at 2-8°C
CONJUGATE	8 weeks at 2-8°C
SUBSTRATE	up to the expiry date at 2-8°C, 1 week at 15-30°C; store in the dark
DILUENT 3	up to the expiry date at 2-8°C
WASH BUFFER 10x	2 weeks 2-8°C; 5 days 15-30°C
STOP SOLUTION	up to the expiry date at 2-8°C

7. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE
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. Avoid the use self-defrosting freezers for the storage of the samples. Defrosted samples must be carefully shaken before the test. Heat-inactivation can rise 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 cannot be used.

The test cannot be applied to plasma.

8. ASSAY PROCEDURE
PREPARATION
Bring all the reagents and samples to room temperature (18-30°C) before use.

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H_2O).
- Dilute samples 1:51 distributing 10 µL of serum into 0.5 mL of diluent.

1. Distribution of the samples: Dispense 100 µL of diluted sample per well (duplicate testing is recommended) or 100 µL of control (positive, negative or cut-off). The minimum requisite is 1 negative control, 1 positive control and 2 cut-off controls. Leave one well for the blank (100 µL of substrate).
2. Incubation: Incubate the plate covered with an adhesive protective film for 45 minutes at 37°C.
3. Washing: Remove the adhesive film, aspirate the contents of all the wells and rinse 4 times, filling each well with 300 µL of washing solution. Wait 30 seconds between each wash.
4. Distribution of the conjugate: Dispense 100 µL of conjugate in each well.

5. Conjugate Incubation: Incubate the plate covered with an adhesive protective film for 45 minutes at 37°C.
6. Washing: Remove the adhesive film, aspirate the contents of all the wells and rinse 4 times, filling each well with 300 µL of washing solution. Wait 30 seconds between each wash.
7. Distribution of the substrate: Dispense 100 µL of the HRP substrate in each well.
8. Substrate incubation: Incubate the plate for 15 minutes at room temperature.
9. Interruption of the reaction: Dispense 100 µL of blocking solution, in the same order as that followed for point 4.
10. Reading: Read the O.D. at 450 nm or 450/620 within 30 minutes. Repeat the reading at 405 nm in case of O.D. > 2.000.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE FOR HERPES SIMPLEX 1 IgG RECOMBINANT

STEP 1	Place 100 µL of diluted sample/controls (positive, negative and cut-off) in the wells of the strips. Mix well.
	-
	Incubate for 45 min. at 37°C
	-
	Wash 4 times (300 µL)
	-
STEP 2	Add 100 µL of conjugate to each well
	-
	Incubate for 45 min. at 37°C
	-
	Wash 4 times (300 µL)
	-
STEP 3	Add 100 µL of Substrate to each well
	-
	Incubate for 15 min. at R.T.
	-
STEP 4	Add 100 µL of Stop Solution
	-
	Read the O.D. at 450 nm or 450/620 nm within 30 min

10. TEST VALIDATION

Negative control: the ratio between the negative control OD and cut-off OD must be < 0.6.
Positive control: the positive control must have an OD at least 1.5 times higher than the cut-off
Cut-off control: the OD of the Cut-off must be > 0.2

Repeat the test, if one of the results of the control sera is not within the acceptability range. If the problem persists contact the Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

Calculate the ratio between the OD value of the sample and that of the Cut-off (Index).

The sample is considered:

POSITIVE: when the Index is > 1.2
DOUBTFUL: for all the values between 0.8 and 1.2
NEGATIVE: when the Index is < 0.8

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

12. LIMITATIONS

A serum sample obtained during the acute phase of infection, when only IgM-class antibodies are present, may be negative by this procedure. The antibodies anti- Herpes Simplex Virus IgM level should be determined using Enzy-Well Herpes Simplex Virus IgM kits. Alternatively, a second serum sample obtained 8-14 days later, should be tested in parallel to determine an increase in the IgG antibody level.
All the positive results require a careful interpretation.
The test cannot be used as only method for a clinical diagnosis.
Negative results may not exclude an eventual infection.
The test result should be used in conjunction with information available from the evaluation of the case history or other diagnostic procedures.

13. REFERENCE RANGE

Among the normal population the expected values, which have been determined by examining 120 sera from healthy donors, were between 0.2 and 0.8 Index.

14. ANALYTICAL SPECIFICITY

5 samples (2 negative, 1 Cut-Off and 2 Positive) containing the following interfering substances were tested:

Rheumatoid Factor (44 – 220 UI/ml)
Bilirubin (4.5 mg/dl – 45 mg/dl)
Triglycerides (10 mg/dl – 250 mg/dl)
Hemoglobin (5 mg/ml – 30 mg/ml)

The presence in the tested serum of the interfering substances listed above did not alter the results of the test.

15. CROSS-REACTIONS

66 samples positive to Rubella, Epstein-Barr Virus, Varicella, Cytomegalovirus, HSV 2 and Toxoplasma were tested.
No significant cross-reactions were found.

16. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In an experimentation, 258 samples were analyzed with the Diesse kit as well as with another commercial method. Below are the schematized results of the trial:

		Reference		
		+	-	Total
Diesse	+	183	1	184
	-	2	72	74
	Total	185	73	258

Percent Positive Agreement (~Diagnostic Sensitivity):
98.9% $CI_{95\%}$: 96.1-99.7
Percent Negative Agreement: (~Diagnostic Specificity):
98.6% $CI_{95\%}$: 92.6-99.7

17. PRECISION

Sample	Within-run Precision		Betweeen-run precision		Precision between batches	
	Mean (Index)	CV%	Mean (Index)	CV%	Mean (Index)	CV%
1	0.3	5.8	0.4	12.5	0.4	15.0
2	0.5	5.3	0.7	10.0	0.6	10.0
3	0.6	8.7	0.8	8.8	0.7	8.6
4	0.7	8.0	0.8	6.3	0.8	-
5	0.9	2.8	1.1	7.3	1.1	-
6	2.7	6.5	3.0	12.3	2.7	7.4
7	3.8	6.6	4.6	7.2	4.4	3.4
8	5.2	5.5	7.2	8.9	6.6	6.1
9	8.2	3.1	10.3	10.2	9.6	5.4
10	11.0	1.8	12.0	7.8	11.8	2.2

18. TROUBLESHOOTING

PROBLEM	POSSIBLE ERROR	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 desiccant must be pale yellow). Repeat test.
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Take new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that plate washer works well
Poor precision	Inadequate aspiration of wells	Ensure that plate washer works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Addition of reagents too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of air-bubbles	Avoid air-bubbles formation 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
	Inadequate volume of substrate added	Check pipette function

19. REFERENCES

1. Arvaja M., Lehtinen M., Koskela P., Lappalainen M., Paavonen J., Vesikari T.; "Serological evaluation of Herpes Simplex Virus type 1 and type 2 infections in pregnancy"; Sexual Transmission Infections , **1999**; 75: 168–171
2. Ashley R.L. et al.; "Genital herpes: review of the epidemic and potential use of type-specific serology"; Clinical of Microbiology Review, **1999**; 12: 1-8
3. Ashley R.L., et al.; "Comparison of Western blot (immunoblot) and glycoprotein G-specific immunoblot assay for detecting antibodies to Herpes Simplex Virus type 1 and 2 in human sera"; Journal of Clinical Microbiology, **1988**; 26: 662-667
4. Ashley R.L., Wu L., Pickering J.W., Tu M.C., Schonorenberg L; " Premarket evaluation of commercial glycoprotein G-based enzyme immunoassay for Herpes Simplex Virus type-specific antibodies"; Journal of Clinical Microbiology, **1998**; 36: 294-295
5. Hashido M., Lee F. K., Inouye S., Kawana T.; "Detection of Herpes Simplex Virus type-specific antibodies by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay based on Glycoprotein G"; Journal of Medical Virology, **1997**; 53: 319-323
6. Whittington W.L., Celum C.L., Cent A., Ashley R.L.; "Use of a glycoprotein G-based type-specific assay to detect antibodies to Herpes Simplex Virus type 2 among persons attending sexually transmitted disease clinics"; Sexual Transmission Diseases, **2001**; 28: 99-104

20. GLOSSARY OF LABELING SYMBOLS

	Date of manufacture
	Use By
	Caution, consult accompanying documents
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
	Temperature limitation
	Consult instructions for use
	Biological risks
REF	Catalogue number
IVD	In vitro diagnostic medical device
LOT	Batch code

Manufactured by
DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (Siena)
Italy

CE