

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Herpes simplex Virus 2 (HSV 2) IgM ELISA



DEHSV2M0540



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS / CONTENIDO

1. INTRODUCTION	3
2. INTENDED USE	3
3. PRINCIPLE OF THE ASSAY.....	3
4. MATERIALS.....	4
5. STABILITY AND STORAGE.....	4
6. REAGENT PREPARATION.....	5
7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION.....	5
8. ASSAY PROCEDURE.....	6
9. RESULTS	7
10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS	8
11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	8
12. PRECAUTIONS AND WARNINGS	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. USO PREVISTO	10
3. PRINCIPIO DEL ENSAYO	10
4. MATERIALES	11
5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE	11
6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	12
7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	12
8. PROCEDIMIENTO	13
9. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS	14
10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	15
11. LIMITACIONES DEL ENSAYO	15
12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS	16
BIBLIOGRAPHY	17
ABBREVIATIONS.....	17
SUMMARY OF TEST PROCEDURE.....	18
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	20

1. INTRODUCTION

Herpes simplex is an enveloped DNA virus (150-200 nm in diameter) belonging to the alpha-herpesviridae. Based on antigenic, biochemical and biological differences it can be divided into two serotypes, HSV-1 and HSV-2. Man is the only known natural host and source of the virus. HSV type 1 typically causes oral herpes, while HSV type 2 typically affects the genital area. Most of the time, HSV-1 and HSV-2 are inactive, or "silent", and cause no symptoms, but some infected people have "outbreaks" of blisters and ulcers. Once infected with HSV, people remain infected for life. Herpes simplex viruses are amongst the most common infectious agents of man, and either HSV type appears to be capable of infecting similar body sites. A high percentage of the adult population is seropositive (appr. 90% HSV-1, in dependence on the socio-economic status 10-30% HSV-2). Primary HSV-1 infection usually occurs in early childhood (6 to 18 months of age). HSV-2 usually produces mild symptoms, and most people have no recognized symptoms. Persons at risk are children with inherited T-cell deficiencies and patients who are immunosuppressed because of infection (e.g. HIV), transplantation, or cancer therapy. HSV-2 can cause potentially fatal infections in infants if the mother is shedding virus at the time of delivery. - HSV-2 may play a major role in the heterosexual spread of HIV: herpes can make people more susceptible to HIV infection, and HIV-infected individuals more infectious.

Species	Disease	Symptoms (e.g.)	Transmission route
HSV-1	Oral herpes (herpes labialis)	Fever, sore throat, lymphadenopathy, Multiple vesicles in the oral/genital mucous membranes, gingivostomatitis	Transmission by droplet infection;
HSV-2	Genital herpes (herpes genitalis) Neonatal herpes (herpes neonatorum)	Complication: HSV can cause potentially fatal infections in infants if the mother has a primary infection at the time of delivery	Sexually transmitted disease (STD); Perinatal; Congenital

Infection or presence of pathogen may be identified by:

- Microscopy
- PCR
- Serology: e.g. by ELISA

2. INTENDED USE

The Herpes Simplex Virus 2 (HSV 2) IgM ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against Herpes Simplex Virus 2 (HSV 2) in human serum or plasma (citrate, heparin).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiterplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

1. **SORB** **MIT** **Microtiterplate**: 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with Herpes Simplex Virus 2 (HSV 2) recombinant antigens gG2; in resealable aluminium foil.
2. **SAM** **DIL** **IgM Sample Dilution Buffer**: 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; anti-human IgG (RF Absorbent); coloured green; ready to use; white cap; ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
3. **STOP** **SOLN** **Stop Solution**: 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
4. **WASH** **SOLN** **20x** **Washing Buffer (20x conc.)**: 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap.
5. **ENZ** **CONJ** **Conjugate**: 1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled antibody to human IgM in phosphate buffer (10 mM); coloured red; ready to use; black cap.
6. **SUB** **TMB** **TMB Substrate Solution**: 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
7. **CAL** **C** **Positive Control**: 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
8. **CAL** **B** **Cut-off Control**: 1 vial containing 3 mL control; coloured yellow; ready to use; green cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
9. **CAL** **A** **Negative Control**: 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Controls are calibrated in arbitrary units against internal quality control specimens, since no international standard reference is available for this assay.

For hazard and precautionary statements see 12.1

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplates
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

5. STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20...25 °C) and mix them before starting the test run!

6.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with recombinant Herpes Simplex Virus 2 (HSV 2) antigens gG2. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

6.2. Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e. g. 10 mL Washing Buffer + 190 mL distilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37°C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

6.3. TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgM Sample Dilution Buffer. Dispense 10 µL sample and 1 mL IgM Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully before performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of Washing Buffer from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour \pm 5 min at 37 ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µL Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.1. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA Microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the plate layout. Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended. **Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.**

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these Instructions for Use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value < **0.100**
- **Negative Control:** Absorbance value < **0.200** and < **Cut-off**
- **Cut-off Control:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control:** Absorbance value > **Cut-off**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43
Cut-off = 0.43

9.2.1. Results in Units [U]

$$\frac{\text{Sample (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Units} = \text{U}]$$

Example:
$$\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ U (Units)}$$

9.3. Interpretation of Results

Cut-off	10 U	-
Positive	> 11 U	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 U	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as negative .
Negative	< 9 U	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.
<p>Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data. In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.</p>		

9.3.1. Antibody Isotypes and State of Infection

Serology	Significance
IgM	Characteristic of the primary antibody response High IgM titer with low IgG titer: → suggests a current or very recent infection Rare: → persisting IgM
IgG	Characteristic of the secondary antibody response May persist for several years High IgG titer with low IgM titer: → may indicate a past infection

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications. For further information about the specific performance characteristics please contact Demeditec Diagnostics GmbH.

10.1. Precision

Intraassay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	24	0.582	6.01
#2	24	1.572	3.93
#3	24	1.656	2.68

Interassay	n	Mean (U)	CV (%)
#1	12	28.76	7.56
#2	12	28.77	8.45
#3	12	3.55	11.92

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte.

It is 97.3% (95% confidence interval: 93.81% - 99.12%).

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.

It is 100% (95% confidence interval: 81.47% - 100%).

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric samples are not observed up to a concentration of 10 mg/mL hemoglobin, 5 mg/mL triglycerides and 0.5 mg/mL bilirubin.

10.5. Cross Reactivity

Investigation of a sample panel with antibody activities to potentially cross-reacting parameters did not reveal evidence of false-positive results due to cross-reactions.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or Microtiterplates of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

12.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



H317	May cause an allergic skin reaction.
P261	Avoid breathing spray.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P362+P364	Take off contaminated and Wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

12.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

1. INTRODUCCIÓN

El virus del herpes simplex es un virus recubierto que contiene A.D.N. de doble cadena lineal, perteneciendo al grupo de los herpesviridae alpha. El genoma del virus esta envuelto en una cápside seguido por fuera de tegumento y una envoltura lipídica. Basándose en diferencias biológicas y bioquímicas se distinguen dos grupos serologicos, el VHS-1 y VHS-2. VHS-1 se encuentra en la área craneal, el VHS-2 sobre todo en la área genital. Los virus causan una infección febril con formación de ampollas en la piel y en las mucosas. El hombre es el unico depóstio de gérmen patógeno. Después de la infección, el virus se replica primeramente en la piel y en las mucosas. El virus se reproduce a travez de la extración de nuevas particulas del virus o por fusión con celulas infectadas con celulas vecinas no infectadas. Finalmente el virus entra en las fibras de las células nerviosas y llega a través del transporte retrógrado al interior de la célula nerviosa donde no es alcanzado por el sistema inmunologico. Existe un periodo de latencia, mientras el genoma del virus se circulariza en forma eliptica, formando solamente unos pocos productos de virus. Diferentes estímulos de caracter endógeno (estress, cambios hormonales) y exógeno (rayos ultra violeta, medicamentos) provocan un nuevo ciclo de replicación. Los nuevos virus llegan por las fibras de las células nerviosas a la periferia y reinfectan las células de las mucosas.

El VHS existe en todo el mundo. La infección ocurre sobre todo en la infancia (>40%). A partir de los 50 años, más del 90 % de la población está infectada. La transmisión del virus se produce mediante microgotitas y/o por contacto con las mucosas. La transmisión de VHS-2 aumenta durante la pubertad. Normalmente, la infección con VHS-2 sólo produce síntomas leves y pasa inadvertida. La infección neonatal sin embargo, ocurre durante el nacimiento al traspasar el canal uterino. Sin tratamiento adecuado la mortalidad alcanza un 75%, o deja un daño permanente. Personas de alto riesgo son niños (sobre todo con deficiencia del sistema de células T) y pacientes inmunodeprimidos (VIH, medicamentos.).

Especies	Enfermedad	Síntomas (p.ej.)	Vía de transmisión
HSV-1	Herpes oral (herpes labial)	Fiebre, dolor de garganta, cervical linfadenopatía, múltiples vesículas en las membranas mucosas orales, Gingivostomatitis	La transmisión por gotitas de infección
HSV-2	Herpes Genital (herpes genitalis) Herpes simple neona- tal (Herpes neonatorum)]	Complicación: VHS puede causar infecciones potencialmente mortales en los bebés si la madre tiene una infección primaria en el momento del nacimiento.	Enfermedad de transmisión sexual (ETS) Perinatal Congénita

La infección o la presencia de un patógeno puede identificarse mediante:

- Microscopia
- PCR
- Serología: p.ej. ELISA

2. USO PREVISTO

El enzimoimmunoensayo Herpes Simplex Virus 2 (HSV 2) IgM ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra Herpes Simplex Virus 2 (HSV 2) en suero o plasma (citrato, heparina) humano.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las Placas de Microtitulación están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unida, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualiza añadiendo sustrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

1. **SORB** **MT** **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos recombinante de Herpes Simplex Virus 2 (HSV2) gG2, en bolsa de aluminio.
2. **SAM** **DIL** **Tampón de Dilución de Muestras IgM:** 1 botella de 100 mL de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH 7,2 ± 0,2; anti-humana IgG (RF Absorbente); color verde; listo para ser utilizado; tapa blanca; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
3. **STOP** **SOLN** **Solución de Parada:** 1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
4. **WASH** **SOLN** **20x** **Tampón de Lavado (20x conc.):** 1 botella de 50 mL de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH 7,2 ± 0,2; tapa blanca.
5. **ENZ** **CONJ** **Conjugado:** 1 botella de 20 mL de conjugado de anticuerpos IgM anti-humano con peroxidasa en tampón de fosfato (10 mM); color rojo; tapa negra; listo para ser utilizado.
6. **SUB** **TMB** **Solución de Sustrato de TMB:** 1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), < 0,1 %; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
7. **CAL** **C** **Control Positivo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
8. **CAL** **B** **Control Cut-off:** 1 botella de 3 mL control; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
9. **CAL** **A** **Control Negativo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 12.1.

Para sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso
- 1 esquema de la placa

4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de Placa de Microtitulación con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37°C
- Dispositivo de lavado manual o automático para Placas de Microtitulación
- Micropipetas para uso de (10-1000 µL)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2...8 °C. Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2...8 °C.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

6.1. Placa de Microtitulación

Las tiras rompibles están recubiertas con antígeno de antígenos recombinante de Herpes Simplex Virus 2 (HSV 2) gG2. Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita de dióxido de silicio y almacenar a 2...8 °C.

6.2. Tampón de Lavado (20x conc.)

Diluir el Tampón de Lavado 1+19; por ejemplo 10 mL del Tampón de Lavado + 190 mL de agua destilada. El Tampón de Lavado diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20...25 °C). En caso de aparecer cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

6.3. Solución de Sustrato de TMB

La solución está lista para su uso y debe almacenarse a 2...8 °C, protegida de la luz. La solución debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si el sustrato se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizado en el ensayo.

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato, heparina) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas a 2...8 °C, en caso contrario deben ser alicuotadas y almacenadas congeladas (-70...-20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con el tampón de dilución para la muestra de IgM, p. e. 10 µL de la muestra con 1 mL de tampón IgM, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8. PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo antes de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavados de tres hasta cinco veces y el volumen de Tampón de Lavado de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (se recomienda determinar en duplicado) en el esquema de la placa suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

1. Pipetear 100 µL de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. Incubar $1 \text{ h} \pm 5 \text{ min}$ a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µL del Tampón de Lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetear 100 µL de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco sustrato A1.
6. Incubar 30 min a la temperatura ambiente ($20 \dots 25^\circ\text{C}$). Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetear 100 µL de Solución de Sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente ($20 \dots 25^\circ\text{C}$). Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de la Solución de Parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el Solución de Sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la Solución de Parada.

8.1. Medición

Ajustar el fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA al cero utilizando el Blanco.

Si por razones técnicas el fotómetro de Placa de Microtitulación de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de este debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la extinción de todos los pocillos con 450 nm y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en el esquema de la placa.

Es aconsejable realizar la medición bicromática a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular el promedio de los valores de extinción de los pocillos correspondientes.

9. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

Para que un ensayo se considere válido, deben seguirse estrictamente las presentes instrucciones de uso y deben cumplirse los siguientes criterios:

- Blanco: valor de la extinción < 0,100
- Control Negativo: valor de la extinción < 0,200 y < Cut-off
- Control Cut-off: valor de la extinción 0,150 – 1,300
- Control Positivo: valor de la extinción > Cut-off

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

9.2. Cálculo del valor de la medición

El Cut-off se obtiene de los valores de la extinción de los dos Controles Cut-off.

Ejemplo: $0,42 \text{ OD Control Cut-off} + 0,44 \text{ OD Control Cut-off} = 0,86:2 = 0,43$
Cut-off = 0,43

9.2.1. Resultados en unidades [U]

$\frac{\text{Promedio valor de la extinción de la muestra} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{unidades} = \text{U}]$

Ejemplo: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ U}$

9.3. Interpretación de los resultados

Cut-off	10 U	-
Positivo	> 11 U	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna).
Zona intermedia	9 – 11 U	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas. Si el resultado es de nuevo en la zona intermedia, la muestra se considera como negativa.
Negativo	< 9 U	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable.

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en pacientes inmunodeprimidos o en neonatos.

9.3.1. Isotipos de anticuerpo y Estado de la Infección

Serología	Significado
IgM	Característica de la respuesta primaria del anticuerpo Alto título de IgM con bajo título de IgG → sugieren una infección muy reciente o aguda Raras: → persistente IgM
IgG	Característica de la respuesta secundaria del anticuerpo Pueden persistir por varios años El alto título de IgG con bajo título de IgM: → pueden indicar una infección pasada

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en el grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

Para obtener más información sobre las características del ensayo, por favor, entre en contacto Demeditec Diagnostics GmbH.

10.1. Precisión

Intra-ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
#1	24	0,582	6,01
#2	24	1,572	3,93
#3	24	1,656	2,68

Inter-ensayo	n	Promedio (U)	CV (%)
#1	12	28,76	7,56
#2	12	28,77	8,45
#3	12	3,55	11,92

10.2. Especificad Diagnóstica

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico. Es 97,3% (95% Intervalo de confianza: 93,81% - 99,12%).

10.3. Sensibilidad de Diagnóstico

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es 100% (95% Intervalo de confianza: 81,47% - 100%).

10.4. Interferencias

Las muestras lipémicas, ictericas e hemolíticas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/mL para triglicéridos, de 0,5 mg/mL para bilirrubina y de 10 mg/mL hemoglobina.

10.5. Reactividad cruzada

Pruebas realizadas con un panel de muestras con distinta actividad de anticuerpos para estudiar parámetros de reactividad no dieron falsos positivos debidos a reactividad cruzada.

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnostico in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y Placa de Microtitulación de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, Pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA sólo está diseñado para personal cualificado siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio deberá utilizar además muestras conocidas.

12.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 4.1)

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención



H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261	Evitar respirar el aerosol.
P280	Llevar guantes/ prendas de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362+P364	Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

12.2. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

BIBLIOGRAPHY

1. Corey, L.; Spear, P. G. (1986): Infections with herpes simplex viruses (1). In *The New England Journal of Medicine* 314 (11), pp. 686–691. DOI: 10.1056/NEJM198603133141105.
2. Dörries, Rüdiger; Kaiser, R.; Schwender, S.; Imrich, H.; Pohl-Koppe, A.; Dörries, K. (1991): Neuere Aspekte zur Diagnose zentralnervöser Virusinfektionen. In *LaboratoriumsMedizin* 15, pp. 99–102.
3. Felgenhauer, K. (1991): Diagnostische Bedeutung der lokal synthetisierten spezifischen Antikörper des Liquor cerebrospinalis. In *LaboratoriumsMedizin* 15, p. 208.
4. Hudnall, S. David; Stanberry, Lawrence R. (2006): Human Herpesvirus Infections. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): *Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 590–620.
5. Kaufman, H.; Martola, E. L.; Dohlman, C. (1962): Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) in treatment of herpes simplex keratitis. In *Archives of ophthalmology* (Chicago, Ill. : 1960) 68, pp. 235–239.
6. Sauerbrei, Andreas (2014): Diagnostik und antivirale Therapie von Herpes-simplex-Virus-Infektionen. In *Der Mikrobiologe* 24, pp. 151–158.
7. Spaar, Friedrich-Wilhelm (1976): Die menschliche Herpes-simplex-Encephalitis und -Meningitis. Eine klinisch-neuropathologische Untersuchung ; 57 zum Teil farbige Abbildungen und 8 Tabellen. Zugl.: Göttingen, Habil.-Schr. 1. Aufl. Stuttgart: Fischer.

ABBREVIATIONS

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

SUMMARY OF TEST PROCEDURE**SCHEME OF THE ASSAY**

Herpes Simplex Virus 2 (HSV 2) IgM ELISA














Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
 Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls on the plate layout supplied in the kit.
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Negative Control	Cut-off Control	Positive Control	Sample (diluted 1+100)
Negative Control	-	100 µL	-	-	-
Cut-off Control	-	-	100 µL	-	-
Positive Control	-	-	-	100 µL	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37 ± 1 °C Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer					
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer					
TMB Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark					
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta