

NovaLisa™

Herpes Simplex Virus 2 (HSV 2)

IgM - ELISA



Enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM-class antibodies against HSV Type 2 in human serum or plasma

Enzymimmunoassay zur qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen Herpes simplex Virus Typ 1 in Humanserum oder Plasma

Enzyme immunoassay pour la détermination qualitative des anticorps IgM contre HSV - 2 en sérum humain ou plasma

Test immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi della classe IgM per Herpes simplex virus tipo 2 nel siero o plasma umano

Enzimoinmunoensayo para la determinación cualitativa de los anticuerpos IgM contra el virus del Herpes simplex tipo 1 en suero o plasma humano

Imunoensaio enzimático para a determinação qualitativa de anticorpos de classe IgM contra o vírus HSV Tipo 2 no soro ou plasma humano

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 6
Deutsch:	Seite	7 bis 12
Francais:	Page	13 à 18
Italiano:	da Pagina	19 a 23
Espanol:	Página	24 a 29
Português:	Página	30 a 35

For further languages please contact our authorized distributors.

Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía	Page / Seite / Page / Pagina / Página	38
---	--	----

Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des symboles / Legenda / Símbolos	Page / Seite / Page / Pagina / Página	39
--	--	----

Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung Testdurchführung/ Résumé de la procedure de test/ Schema della procedura/ Resumen de la técnica	Page / Seite / Page/ / Pagina / Página	40
--	---	----

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	Mechanism of Infection
HSV-2 (Herpes genitalis)	Genital herpes	Self-healing lesions, flu-like symptoms (fever, swollen glands), Ulcers	Sexually transmitted disease (STD)
	Neonatal herpes		

The presence of virus resp. infection may be identified by

- Microscopy: CPE, IF
- PCR
- Serology: Detection of antibodies by ELISA

2. INTENDED USE

The NovaTec HSV 2 IgM recombinant ELISA allows the detection of HSV 2 infection in presence of antibodies to HSV 1 in human serum or plasma (citrate).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of IgM-class antibodies against HSV Type 2 is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are pre-coated with HSV Type 2 recombinant antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-human IgM conjugate is added. This conjugate binds to the captured HSV Type 2 specific antibodies. 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 HSV Type 2 specific IgM antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **HSV Type 2 Coated Wells (IgM):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with HSV Type 2 recombinant antigen; in resealable aluminium foil.
- **IgM Sample Diluent ***:** 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; containing antihuman-IgG; pH 7.2 ± 0.2; coloured green; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.
- **HSV Type 2 anti-IgM Conjugate**:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled rabbit antibody to human IgM; coloured red, ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
- **HSV Type 2 IgM Positive Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- **HSV Type 2 IgM Cut-off Control***:** 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
- **HSV Type 2 IgM Negative Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.

* contains 0.1 % Bronidox L after dilution

** contains 0.2 % Bronidox L

*** contains 0.1 % Kathon

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The 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, samples and controls to room temperature (20...25°C) before starting the test run!

6.1. Coated snap-off Strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with HSV Type 2 antigen. Store at 2...8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

6.2. HSV Type 2 anti-IgM Conjugate

The bottle contains 20 ml of a solution with anti-human-IgM horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert red dye. The solution is ready to use. Store at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.3. Controls

The bottles labelled with Positive, Cut-off and Negative Control contain a ready to use control solution. It contains 0.1% Kathon and has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.4. IgM Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, anti human-IgG, stabilizers, preservatives and an inert green dye. It is used for the dilution of the patient specimen. The solution contains antihuman IgG class antibodies to eliminate competitive inhibition from specific IgG class antibody to remove rheumatoid factor. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.5. Washing Solution (20xconc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute washing solution 1+19; e.g. 10 ml washing solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature. *Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date.*

6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. 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. After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date.*

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2...8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 to -70°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 Diluent. Dispense 10µl sample and 1 ml IgM Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank,
1 well	(e.g. B1)	for the negative control,
2 wells	(e.g. C1+D1)	for the cut-off control and
1 well	(e.g. E1)	for the positive control.

It is recommended to determine controls and patient samples in duplicate, if necessary.

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

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

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 100µl controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 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 300µl of Washing Solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle 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 critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

5. Dispense 100µl HSV Type 2 anti-IgM Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature. Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.

Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with physiological sodium chloride solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with dilution buffer and multiply the results in NTU by 2.

11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 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 control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value < **0.100**.
- **Negative control** in B1: Absorbance value < **0.200 and < cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.30**.
- **Positive control** in E1: 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 0.39 + absorbance value Cut-off control 0.37 = 0.76 / 2 = 0.38

$$\text{Cut-off} = 0.38$$

9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 10% over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 10% above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative

→ **grey zone**

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

9.3.1. Results in NovaTec Units

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

Example: $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-off:	10	NTU
Grey zone:	9-11	NTU
Negative:	<9	NTU
Positive:	>11	NTU

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

<u>Interassay</u>	<u>n</u>	<u>Mean</u>	<u>Cv (%)</u>
Pos. Serum	14	12	5.6
	14	37	4.2
<u>Intraassay</u>	<u>n</u>	<u>Mean</u>	<u>Cv (%)</u>
Pos. Serum	24	0.46	6.9
	20	1.3	7.7

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 >95 %.

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 >95 %.

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.2 mg/ml bilirubin.

Note: The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

10.5. Cross-Reactivity

<u>Serum</u>	<u>Acute Infection</u>	<u>NovaTec Elisa HSV-2 IgM</u>
1	Adenovirus	neg.
3	CMV	neg.
8	EBV	neg.
9	Echinococcus	neg.
12	HBV	neg.
17	Influenza A	neg.
18	Influenza B	neg.
22	Leptospira	neg.
23	M. pneumoniae	neg.
26	Picornia	neg.
27	Q-Fever	neg.
29	Rubella	neg.
32	Toxoplasm.	neg.
34	VZV	neg.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore 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 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. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips 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 control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaLisa™ ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING:	In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!
----------	---

WARNING:	Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!
----------	--

12.1. 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.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: HSV2M0540 HSV Type 2 recombinant gG2 IgM -ELISA (96 Determinations)

1. EINLEITUNG

Das Herpes-simplex-Virus ist ein umhülltes, eine lineare doppelsträngige DNA enthaltendes Virus, das zur Gruppe der Alpha-herpesvirinae gehört. Das virale Genom ist in ein Kapsid verpackt, an welches sich nach außen Tegument und Lipidhülle anschließen. Basierend auf biologischen und biochemischen Unterschieden lassen sich zwei Serogruppen, HSV-1 und HSV-2, unterscheiden. HSV-1 wird im Kopfbereich, HSV-2 vor allem im Genitalbereich gefunden. Die Viren verursachen eine fieberhafte Infektion mit Bläschenbildung an Haut und Schleimhäuten. Der Mensch stellt das alleinige Erregerreservoir dar.

Nach der Infektion repliziert das Virus zunächst lokal in Haut- und Schleimhautepithelzellen. Es kann sich dann entweder durch Ausschleusen neuer Viruspartikel oder durch Fusion infizierter mit nicht-infizierten Nachbarzellen weiter ausbreiten. Schließlich gelangt dringt das Virus in Nervenzellfortsätze ein und wird durch retrograden Transport in die entsprechenden Nervenzellen transportiert, in denen die Viren nicht vom Immunsystem abgetötet werden können. Es bildet sich eine temporäre Latenz aus, während der das Genom zirkularisiert in episomaler Form vorliegt und nur wenige virale Produkte gebildet werden. Verschieden endogene (Stress, hormonelle Veränderungen) und exogene (UV-Strahlung, Medikamente) Stimuli können einen erneuten vollständigen Replikationszyklus auslösen. Neugebildete Viren gelangen über die Nervenzellfortsätze in die Peripherie und führen zur Reinfektion von Schleimhautzellen.

HSV kommt weltweit vor. Die Übertragung von HSV-1 erfolgt vor allem (>40 %) in der frühen Kindheit. Bis zum 50. Lebensjahr sind über 90% infiziert. Die Übertragung erfolgt durch Tröpfcheninfektion und Schleimhautkontakt. Die HSV-2-Übertragung steigt während der Pubertät an. HSV-2 verursacht in der Regel nur milde Symptome und verläuft meist subklinisch. Die neonatale HSV-Infektion, bei der sich das Neugeborene während des Durchtritts durch den Geburtskanal infiziert, verläuft jedoch ohne Therapie zu ca. 75 % tödlich oder hinterlässt Dauerschäden. Ca. 70% dieser Infektionen sind durch HSV-2 verursacht. Risikopersonen sind Kinder (insbesondere mit angeborenen T-Zell-Defekten) und Immunsupprimierte (HIV, Medikamente).

Spezies	Vorkommen	Übertragungsweg	Kardinalsymptome	Komplikationen	Diagnostik
HSV-1 (Herpes labialis)	weltweit, Mensch	Tröpfchen, (Schmierinfektion)	vorwiegend im Kopfbereich Lymphknotenschwellung, Bläschen	Meningitis, Enzephalitis neonatale Infektion	klinisches Bild (Serologie)
HSV-2 (Herpes genitalis)			Genitalbereich		

Nachweis:

- Mikroskopie: CPE, Immunfluoreszenz
- PCR
- Serologie: Nachweis von Antikörpern mittels ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK

Der NovaTec Herpes Simplex Virus Typ 2 IgM ELISA (rekombinant) ist für den qualitativen Nachweis typspezifischer IgM-Antikörper gegen Herpes simplex Virus Typ 2 (HSV-2) in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt. Die Verwendung von rekombinantem gG2-Antigen ermöglicht den Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen HSV-2 in Gegenwart von Antikörpern gegen HSV-1.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen IgM-Antikörpern gegen das HSV-2 beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik. Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit HSV-2-spezifischen rekombinanten Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierte anti-human-IgM Antikörper binden an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB) - Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **HSV-2 beschichtete Mikrotiterstreifen (IgM):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit rekombinantem HSV-2-Antigen (gG2); in wiederverschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgM-Probenverdünnungspuffer***:** 1 Flasche mit 100ml Puffer zur Probenverdünnung; enthält antihuman-IgG-Antikörper; pH 7.2 ± 0.2; grün gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml Schwefelsäure, 0.2 mol/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.

- **Waschlösung (20x konz.)***: 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.
 - **HSV-2 anti-IgM-Konjugat****: 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgM; rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
 - **TMB-Substratlösung**: 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
 - **HSV-2 IgM Positivkontrolle*****: 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
 - **HSV-2 IgM Cut-off Kontrolle*****: 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
 - **HSV-2 IgM Negativkontrolle*****: 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- * enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung
 ** enthält 0.2 % Bronidox L
 *** enthält 0.1 % Kathon

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25°C) zu bringen!

6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit rekombinantem HSV-2 Antigen gG2 beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

6.2. HSV-2 anti-IgM-Konjugat

Die Flasche enthält 20 ml einer Lösung von anti-human IgM-Meerrettichperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten roten Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.3. Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten 2 bzw. 3 ml gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8°C aufzubewahren und enthalten 0.1 % Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.4. IgM-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten grünen Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung enthält antihuman-IgG-Antikörper, um den Proben spezifische IgG-Anteile sowie IgG-gebundene Rheumafaktoren zu entziehen. Sie wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt und ist bei 2-8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.6. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum Verfallsdatum bei sachgerechter Lagerung von 2...8°C.*

6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8°C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70...-20°C). Wiederaufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!* Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit IgM-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10µl Probe und 1 ml IgM-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

1 Vertiefung	(z.B. A1)	für den Substratleerwert (Blank),
1 Vertiefungen	(z.B. B1)	für die Negativ Kontrolle und
2 Vertiefungen	(z.B. C1+D1)	für die Cut-off Kontrolle und
1 Vertiefung	(z.B. E1)	für die Positiv Kontrolle vorsehen

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ einstellen.

1. Je 100 µl Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h \pm 5 min bei 37°C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!

5. 100µl HSV-2 anti-IgM-Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*

Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit IgM-Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in NTU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.

11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in A1 den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion < **0,100**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion < **0,200 und < cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionswerte **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionswerte > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

Beispiel: $0.37 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0.39 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0.76 : 2 = \underline{0.38}$

$$\text{Cut-off} = \underline{0.38}$$

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 10 % über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**

Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % unterhalb des Cut-Offs liegt.

9.3.1. Ergebnisse in NovaTec-Einheiten [NTU]

Mittlere Extinktion der Patientenprobe x 10 = [NovaTec-Einheiten = NTU]
Cut-Off

Beispiel: $\frac{1.782 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off:	10	NTU
Grauzone:	9-11	NTU
Negativ:	<9	NTU
Positiv:	>11	NTU

10. TESTMERKMALE

10.1. Präzision

Interassay	n	Mittelwert	Vk (%)
Pos. Serum	14	12	5.6
	14	37	4.2
Intraassay	n	Mittelwert	Vk (%)
Pos. Serum	24	0.46	6.9
	20	1.3	7.7

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt > 95%.

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt > 95%.

10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,2 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

10.5. Kreuzreaktivität

Serum	akute Infektion	NovaTec Elisa HSV-1 IgM
1	Adenovirus	neg.
3	CMV	neg.
8	EBV	neg.
9	Echinococcus	neg.
12	HBV	neg.
17	Influenza A	neg.
18	Influenza B	neg.
22	Leptospira	neg.
23	M. pneumoniae	neg.
26	Picorna	neg.
27	Q-Fever	neg.
29	Rubella	neg.
32	Toxoplasma	neg.
34	VZV	neg.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert. Der Nachweis von IgM-Antikörpern gegen HSV-1 oder HSV-2 bedeutet keine Immunität für nachfolgende Infektionen.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der NovaLisa™ ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG:	Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.
WARNUNG:	Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: HSV2M0540 HSV Typ 2 rekombinant gG2 IgM ELISA (96 Bestimmungen)

1. INTRODUCTION

Herpès simplex est un virus d'ADN enveloppé (150-200 nm de diamètre) appartenant aux alpha-herpesviridae. Basé sur des différences antigéniques, biochimiques et biologiques Herpès simplex peut être divisé en deux sérotypes, HSV-1 et HSV-2. L'homme est le seul hôte naturel et la seule source connue du virus. HSV-1 cause l'herpès buccal, alors que le HSV-2 affecte la région génitale. HSV-1 et HSV-2 sont inactifs pour la plupart du temps, ou "silencieux", et ne causent aucun symptôme, mais quelques personnes infectées ont des "manifestations" de boursouffures et d'ulcères. Une fois infecté avec HSV, les gens restent infectés pendant la vie. Les virus d'herpès simplex sont parmi les agents infectieux les plus communs, et l'un ou l'autre type d'HSV semble être capable d'infecter des parties du corps semblables à plusieurs reprises. Un pourcentage élevé de la population adulte est séropositif (environ 90% HSV-1, et, selon les conditions socio-économiques, 10-30% HSV-2). D'habitude, l'infection primaire d'HSV-1 se produit tôt dans l'enfance (6 à 18 mois d'âge). HSV-2 produit généralement des symptômes doux, et la plupart des personnes n'ont aucun symptôme identifié. Parmi les groupes à risque sont des enfants avec une insuffisance immunitaire héréditaire (cellule-T), et des patients qui sont immuno- supprimés en raison d'une infection (par exemple HIV), d'une transplantation, ou d'une thérapie de cancer.

Espèce	La maladie	Symptômes	Mécanisme de l'infection
HSV-1 (herpès labialis)	Herpès buccal gingivostomatite herpétique primaire; complications : kératite herpétique et encéphalite herpès labialis récurrent	Vésicules multiples dans les membranes muqueuses orales Boursouffures de fièvre sur la bouche ou le visage	Transmission par infection de gouttelettes

La présence d'une infection peut être identifiée par

- Microscopie : CPE, IF
- PCR
- Sérologie : Détection des anticorps par ELISA

2. UTILISATION PRÉVUE

L'ELISA d'IgM HSV-2 de NovaTec est prévu pour la détermination qualitative des anticorps IgM contre HSV-2 en sérum humain ou plasma (citrate).

3. PRINCIPE DE L'ANALYSE

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps IgM contre HSV-2 est basée sur la technique d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Des puits dans les bandes du plaque microtitre sont recouvertes de protéine recombinante gG2 pour attacher les anticorps correspondants du spécimen. Après le lavage des puits ayant pour but d'enlever l'échantillon détaché, l'anti-humain IgM conjugué à HRP (horseradish peroxidase) est ajouté. Ce conjugué s'attache aux anticorps spécifiques pour HSV-2. Le complexe immun constitué par le conjugué attaché est visualisé en ajoutant le substrat de Tetraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgM spécifiques pour HSV-2 dans le spécimen. De l'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. L'absorbance à 450 nm est lue en utilisant un lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA.

4. MATÉRIAUX

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'HSV-2 (IgM) :** 12 bandes cassables contenant 8 puits recouvertes de protéine recombinante gG2 ; en sachets d'aluminium refermables.
- **Diluant de l'échantillon IgM *** :** 1 bouteille contenant 100 ml d'amortisseur pour la dilution de l'échantillon ; pH 7.2 ± 0.2 ; coloré vert ; prêt à utiliser ; couvercle blanc.
- **Solution D'Arrêt :** 1 bouteille contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.2 mol/l ; prêt à utiliser ; couvercle rouge.
- **Solution de lavage (20x concentré.) * :** 1 bouteille contenant 50 ml d'un amortisseur 20-fois concentré (pH 7.2 ± 0.2) pour laver les puits ; couvercle blanc.
- **Conjugué anti-IgM HSV-2 ** :** 1 bouteille contenant 20 ml d'anticorps de lapin conjugués à peroxydase contre l'IgM humain ; coloré rouge, prêt à utiliser ; couvercle noir.
- **Solution de substrat de TMB :** 1 bouteille contenant 15 ml 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB) ; prêt à utiliser ; couvercle jaune.
- **Contrôle positif d'IgM HSV-2 *** :** 1 bouteille contenant 2 ml ; coloré jaune ; prêt à utiliser ; couvercle rouge.
- **Contrôle cut-off d'IgM HSV-2 *** :** 1 bouteille contenant 3 ml, coloré jaune ; prêt à utiliser ; couvercle vert.
- **Contrôle négatif d'IgM HSV-2 *** :** 1 bouteille contenant 2 ml ; coloré jaune ; prêt à utiliser ; couvercle bleu.

- * contient 0.1 % de Bronidox L après dilution
- ** contient 0.2 % de Bronidox L
- *** contient 0.1 % de Kathon

4.2. Matériaux fournis

- 1 support de bande
- 1 couverture autocollante
- 1 protocole d'essai
- 1 plan de distribution et d'identification

4.3. Matériaux et équipement requis

- lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA, équipé pour le mesurage de l'absorbance à 450/620nm
- Incubateur 37°C
- Équipement manuel ou automatique pour rincer les puits
- Pipettes pour usage entre 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau désionisée ou (fraîchement) distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITÉ ET STOCKAGE

Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'échéance indiquée sur l'étiquette une fois stockés à 2... 8°C.

6. PRÉPARATION DE RÉACTIF

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient à la température de la pièce (20... 25°C) avant de commencer l'analyse !

6.1. Bandes recouvertes cassables

Les bandes cassables sont recouvertes de protéine recombinante gG2 et sont prêt à utiliser. Conserver à 2... 8°C *Après avoir détaché des bandes, les bandes restantes devraient tout de suite être refermées dans le sachet d'aluminium avec le desiccant fourni et être conservées à 2... 8°C; stable jusqu'à la date d'échéance. Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.2. Conjugué anti-IgM HSV-2

La bouteille contient 20ml d'une solution avec de la peroxydase de raifort anti-humaine-IgM, l'amortisseur, les stabilisateurs, les préservatifs et un colorant rouge inerte. La solution est prêt à utiliser. Conserver à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.3. Contrôles

Les bouteilles marquées avec contrôle positif, contrôle cut-off et contrôle négatif contiennent une solution de contrôle prêt à utiliser. Elle contient 0.1% Kathon et doit être stockée à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2...8°C.*

6.4. Diluant de l'échantillon IgM

La bouteille contient 100ml d'un amortisseur de phosphate, des stabilisateurs, des préservatifs et un colorant vert inerte. Elle est employée pour la dilution de l'échantillon du patient. Cette solution prêt à utiliser doit être stocké à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.5. Solution de lavage (20x conc.)

Le flacon contient 50 ml d'un tampon concentré, des détergents, des stabilisants et des conservateurs. Diluer la solution de lavage au 1/20^{ème} ; par exemple 10 ml de la solution de lavage + 190 ml d'eau bidistillée récente et non contaminée. *Le tampon dilué est stable pendant cinq jours si conservé à +2...+8°C. Le tampon concentré reste stable jusqu'à la date de péremption s'il est conservé à +2...+8°C. Les cristaux dans la solution disparaissent en chauffant à 37°C dans un bain marie.*

6.6. Solution de substrat de TMB

La bouteille contient 15ml d'un système de peroxyde de tetramethylbenzidine/hydrogen. Le réactif est prêt à utiliser et doit être stocké à 2... 8°C, loin de la lumière. *La solution devrait être sans couleur ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat se transforme en bleu, il a pu être contaminé et devrait être remplacé. Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.7. Solution d'arrêt

La bouteille contient 15ml d'une solution acide sulfurique de 0.2 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prêt à utiliser et doit être stocké à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

7. COLLECTION ET PRÉPARATION DES SPÉCIMENS

Utilisez des échantillons de sérum humain ou plasma (citrate) pour cette analyse. Si l'analyse est exécutée dans un délai de 5 jours après la collection de l'échantillon, le spécimen devrait être maintenu à 2... 8°C ; autrement ils devraient être aliquotés et conservés surgelés (-20 à -70°C). Si les échantillons sont conservés congelés, mélangez les échantillons décongelés bien avant l'analyse. *Évitez congélation et décongélation répétée.*

L' inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7.1. Dilution de l'échantillon

Avant l'analyse, tous les échantillons devraient être dilués 1+100 avec le diluant de l'échantillon IgM.

Diluer 10µl de l'échantillon avec 1ml du diluant de l'échantillon IgM dans des tubes pour obtenir une dilution 1+100 et mélanger celle-ci soigneusement par un Vortex.

8. PROCÉDÉ D'ANALYSE

8.1. Préparation d'analyse

Lire attentivement la notice d'emploi **avant** de réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. La technique de dosage suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le dosage doit être effectué sur un automate, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume de la solution de lavage de 300 à 350 µl. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur la feuille fournie dans la trousse, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des étalons. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Veillez assigner au moins :

1 puits	(par exemple A1)	pour le blanc substrat,
1 puits	(par exemple B1)	pour le contrôle négatif
2 puits	(par exemple C1+D1)	pour le contrôle cut-off et
1 puits	(par exemple E1)	pour le contrôle positif.

C'est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient deux fois, si nécessaire.

Exécutez toutes les étapes de l'analyse dans l'ordre donné et sans délai entre les étapes.

Une pointe de pipette propre et jetable devrait être employée pour aliquoter chaque contrôle et échantillon.

Ajuster l'incubateur à 37° ± 1°C.

1. Pipettez 100µl de contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Gardez le puits A1 pour le substrat blanc.
2. Couvrez les puits de couvertures autocollantes.
3. **Incuber pour 1 heure ± 5 minutes à 37±1°C.**
4. Quand l'incubation a été accomplie, enlevez la couverture, aspirez le contenu des puits et lavez chaque puits trois fois avec 300µl de solution de lavage. Évitez les débordements des puits de réaction. Le temps de trempage entre chaque cycle de lavage devrait être > 5sec. À la fin, enlevez soigneusement le fluide restant en tapant les bandes sur des papiers en tissu avant la prochaine étape !
Note : Le lavage est décisif ! Un lavage insuffisant peut mener à une précision faible et à des valeurs d'absorbance faussement élevées.
5. Pipettez 100µl du conjugué anti-IgM HSV-2 dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermez avec la couverture autocollante.
6. **Incuber pendant 30 minutes à la température de la pièce.** *Ne pas exposer à la lumière du soleil directe.*
7. Répétez l'étape numéro 4.
8. Pipetter 100µl de la solution de substrat de TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à la température de la pièce dans l'obscurité.**
10. Pipetter 100µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat de TMB. *N'importe quelle couleur bleue développée pendant l'incubation se transforme en jaune.*
Note : Des échantillons de patients fortement positifs peuvent causer des précipités foncés du chromogène ! Ces précipités peuvent influencer les valeurs mesurées de la densité optique. Il est recommandé de diluer l'échantillon avec la solution physiologique de chlorure de sodium, par exemple 1+1. Ensuite diluer l'échantillon 1+100 avec l'amortisseur et multiplier les résultats en NTU (NovaTec units) par 2.
11. Mesurer l'absorption du spécimen à 450/620nm dans un délai de 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

8.2. Mesurage

Ajuster le lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA à **zéro** en utilisant le **substrat blanc dans le puits A1**.

Si - pour raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le substrat blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorption du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorption mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorption de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorption pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Une lecture bichromatique de longueur d'onde employant 620 nm comme longueur d'onde de référence est recommandée.

En cas de plusieurs mesurages, calculer les **valeurs moyennes d'absorption** de tous les résultats.

9. RÉSULTATS

9.1. Critères De Validité

Afin qu'une analyse soit considérée valide, les critères suivants doivent être respectés :

- **Blanc Substrat** dans A1 : Valeur d'absorbance < **0,100**.
- **Contrôle négatif** dans B1 : Valeur d'absorbance < **0,200 et < cut-off**
- **Contrôle seuil (cut-off)** dans C1 et D1: Valeur d'absorbance **0,150 – 1,30**
- **Contrôle positif** dans E1 : Valeur d'absorbance > **contrôle seuil (cut-off)**.

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

9.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du contrôle seuil (cut-off).

Exemple : 0,37 DO cont. seuil + 0,39 DO cont. seuil = 0,76 ÷ 2 = 0,38

$$\text{« Cut-off »} = 0,38$$

9.3. Interprétation des résultats

Des échantillons sont considérés **POSITIFS** si la valeur d'absorption est plus élevée que 10% au-dessus du « cut-off ».

Des échantillons avec une valeur d'absorption de 10% au-dessus ou au-dessous du « cut-off » ne devraient pas être considérés comme clairement positifs ou négatifs

→ **zone grise**

Il est recommandé de répéter l'analyse après 2 - 4 semaines avec un échantillon frais. Si les résultats de la deuxième analyse sont encore dans la zone grise l'échantillon doit être considéré **NÉGATIF**.

Des échantillons sont considérés **NÉGATIFS** si la valeur d'absorption est inférieure à 10% au-dessous du « cut-off ».

9.3.1. Résultats en unités NovaTec

Valeur (moyenne) d'absorption du patient x 10 = [unités NovaTec = NovaTec units= NTU]
« cut-off »

Exemple : $\frac{1,786 \times 10}{0,38} = 47$ NTU

« Cut-off » :	10	NTU
Zone grise :	9-11	NTU
Négatif :	< 9	NTU
Positif :	> 11	NTU

10. CARACTÉRISTIQUES D'EXÉCUTION

10.1. Précision

<u>Inter-analyse</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>cv (%)</u>
Sérum pos.	14	12	5.6
	14	37	4.2
<u>Intra-analyse</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>cv (%)</u>
Sérum pos.	24	0.46	6.9
	20	1.3	7.7

10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est supérieure à >95%.

10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est supérieure à >95%.

10.4. Interférence

Aucune interférence n' a été observée sur des sérums hémolytiques, lipémiques ou ictériques pour des concentrations allant jusqu' à 10 mg/ml d' hémoglobine, 5 mg/ml de triglycérides et 0.2 mg/ml de bilirubine.

Ces résultats s' appuient sur les groupes d' échantillons étudiés ; il n' agit pas de caractéristiques techniques garanties.

10.5. Réactivité croisée

Sérum	Infection aiguë	NovaTec Elisa HSV-2 IgM
1	Adenovirus	neg.
3	CMV	neg.
8	EBV	neg.
9	Echinococcus	neg.
12	HBV	neg.
17	Influenza A	neg.
18	Influenza B	neg.
22	Leptospira	neg.
23	M. pneumoniae	neg.
26	Picorna	neg.
27	Q-Fever	neg.
29	Rubella	neg.
32	Toxoplasm.	neg.
34	VZV	neg.

11. LIMITATIONS DU PROCÉDÉ

Une contamination bactérienne ou des cycles gel-dégel répétés du spécimen peuvent affecter les valeurs d'absorption. Le diagnostic d' une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d' une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l' histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques.

Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunocompromis et des nouveaux-nés.

12. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l' article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l' utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l' information, les précautions et mises en garde de la notice d' emploi, doivent être suivies de façon stricte. L' utilisation de ces trousses avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l' utilisation avec d' autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l' utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n' est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n' est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les composants d' origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d' autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l' étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l' évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le NovaLisa™ ELISA est uniquement destiné à l' utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

AVERTISSEMENT : Dans la concentration utilisée, Bronidox L ne pose pratiquement aucun risque toxicologique lors du contact avec la peau et les membranes muqueuses !

AVERTISSEMENT : L'acide sulfurique irrite les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. Lors du contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l' eau et consulter un médecin !

12.1. Mesures d'élimination

Les résidus de réactifs et des préparations sont considérés comme de déchets potentiellement dangereux. L'élimination de ces déchets est soumise à des réglementations nationales et locales. Contacter les autorités locales ou les sociétés spécialisées pour obtenir des conseils sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION DE COMMANDES

Numéro de Produit : HSV2M0540 HSV-2 IgM-ELISA (96 déterminations)

1. INTRODUZIONE

Il virus dell'Herpes Simplex (HSV) è un virus con DNA a doppia elica di cui si conoscono due tipi antigenici strettamente correlati, l'HSV 1 e l'HSV 2. L'HSV 1 (herpes labialis) provoca lesioni localizzate principalmente alle zone extragenitali (labbra, faccia, etc.) mentre l'HSV2 (herpes genitalis) determina lesioni della zona genitale. I virus causano una infiammazione della pelle, caratterizzata da gruppi di piccole vesciche dolorose. Dopo l'infezione il virus si riproduce nelle cellule dell'epitelio della pelle e delle mucose. Alla fine si introduce nelle cellule dei nervi, dove non può essere raggiunto dal sistema immunitario. In queste cellule è capace di resistere a lungo in una fase di latenza. La malattia può ricorrere in momenti di stress, cambiamenti ormonali, esposizione a raggi ultravioletti etc. L'HSV1 e l'HSV2 sono a diffusione ubiquitaria. La trasmissione di HSV1 avviene soprattutto (>40%) nel periodo infantile. All'età di 50 anni sono infettate più del 90% delle persone. La trasmissione avviene attraverso goccioline sospese nell'aria e attraverso il contatto diretto con le mucose. L'HSV2 è una malattia a trasmissione sessuale. Le infezioni sono spesso asintomatiche o si manifestano con sintomi molto leggeri. L'infezione del neonato da HSV2 durante il parto da madre infetta è letale nel 15% dei casi oppure può causare handicap gravi.

Specie	Malattia	Sintomi	Modo d'infezione
HSV-1	Herpes labialis	infiammazione della pelle, caratterizzata da gruppi di piccole vesciche dolorose	Trasmissione: aerea; contatto diretto con le mucose.
HSV-2	Herpes genitalis		

Diagnosi

- Microscopia; immunofluorescenza indiretta IFA
- PCR
- Sierologia: ELISA

2. USO PREVISTO

Il NovaTec HSV-2 IgM ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgM per HSV-2 nel siero o plasma (citrato) umano. Usando gli antigeni ricombinanti gG2 è possibile provare anticorpi IgM contro HSV-2 con la presenza di anticorpi contro HSV2.

3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgM per HSV-2 si basa sul principio ELISA. I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con antigeni ricombinanti specifici del HSV-2. Anticorpi specifici nel campione si legano agli antigeni immobilizzati nei pozzetti. Gli anticorpi del coniugato (perossidasi di rafano-anticorpi anti-IgM umani) si legano ai complessi antigene (fase solida)-anticorpo (paziente) nei campioni positivi. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per il HSV-2 di classe IgM presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Micropiastre con antigeni del HSV-2 (IgM):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesivi antigeni ricombinanti del HSV-2; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgM***:** 1 flacone contenente 100 ml di diluente per campioni; pH 7.2 ± 0.2; color verde; pronto all'uso; tappo bianco; contiene anticorpi anti IgG umani.
- **Soluzione stop:** 1 flacone contenente 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):*** 1 flacone contenente 50 ml di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH 7.2 ± 0.2; tappo bianco.
- **Coniugato HSV-2 anti IgM**:** 1 flacone contenente 20 ml di anticorpi di coniglio anti-IgM umani, coniugati a perossidasi; color rosso; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione TMB:** 1 flacone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- **HSV-2 IgM Controllo positivo***:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- **HSV-2 IgM Controllo Cut-off***:** 1 flacone da 3 ml; color giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- **HSV-2 IgM Controllo negativo***:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo blu; pronto all'uso.

* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione

** contiene 0.2 % Bronidox L

*** contiene 0.1 % Kathon

4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso!

6.1. Micropiastre

I pozzetti sono separabili. Contengono adesivi antigeni ricombinanti inattivati del HSV-2. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2-8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.2. Coniugato HSV-2 IgM

Il flacone contiene 20 ml di anticorpi anti-IgM umani coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti e un colorante inerte rosso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.3. Controlli

I flaconi dei controlli contengono di soluzione pronta all'uso. Contengono 0,1% Kathon. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.4. Tampone diluente IgM

Il flacone contenente 100 ml di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante verde inerte. La soluzione contiene anticorpi anti IgG umani per togliere dai campioni gli anticorpi specifici della classe IgG ed i fattori reumatici legati ad anticorpi IgG. Viene usata per diluire i campioni. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.

6.5. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino a 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37°C prima di diluire. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.6. Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.7. Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 ml di acido solforico, 0,2 mol/l (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Usare campioni di siero o plasma (citrate) umano. Se il test viene fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2-8°C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra -70...-20°C. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.*

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1 + 100 con tampone diluente IgM. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone e mescolare bene (Vortex).

8. PROCEDIMENTO

8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350µl per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre.

Utilizzare almeno:

1 pozzetto	(es. A1)	per il bianco-substrato (blank)
1 pozzetti	(es. B1)	per il controllo negativo
2 pozzetti	(es. C1+D1)	per il controllo Cut-off
1 pozzetto	(es. E1)	per il controllo positivo.

È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

Regolare l'incubatore a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$

1. Pipettare 100 µl di controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora \pm 5 min a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiettare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.
Attenzione: Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.
5. Pipettare 100µl di Coniugato HSV-2 anti-IgM in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente ($20^{\circ}\dots25^{\circ}\text{C}$).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente ($20^{\circ}\dots25^{\circ}\text{C}$) al buio.**
10. Pipettare 100µl di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*
Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni con soluzione fisiologica NaCl, esempio 1+1. Poi diluire normalmente 1+100 con tampone diluente IgM. Il risultato NTU viene moltiplicato per due.
11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) a **zero** usando il substrato-bianco (blank) **in A1**. Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

9. RISULTATI

9.1. Validazione del test

Il test é valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato bianco** in A1: Valore di assorbanza < **0.100**
- **Controllo negativo** in B1: Valore di assorbanza < **0.200 e < cut-off**
- **Controllo Cut-off** in C1 e D1: Valore di assorbanza **0.150 – 1.30**
- **Controllo positivo** in E1: Valore di assorbanza > **Cut-Off**

Se non vengono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-Off e' la media dei valori di assorbanza dei controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.39 + valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.37 = 0.76/2 = 0.38
Cut-Off = 0.38

9.3. Interpretazione dei risultati

I campioni sono **positivi**, se l'assorbanza supera il Cut-Off almeno del 10 %.

Campioni con assorbanze del 10 % al di sopra o al di sotto del Cut-Off non sono identificabili come positivi o negativi → **Dubbio**

In questo caso é raccomandato di ripetere il test dopo 2 o 4 settimane con un campione fresco. Se il risultato é ancora incerto viene considerato **negativo**.

I campioni sono **negativi**, se l'assorbanza risulta inferiore del Cut-Off almeno del 10 %.

9.3.1. Risultati in unità NovaTec [NTU]

Assorbanza media del campione x 10 = [unità NovaTec = NTU]
Cut-Off

Esempio: $\frac{1.782 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off :	10	NTU
Dubbio:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

10. CARATTERISTICHE DEL TEST

10.1. Precisione

Intradosaggio	n	Media (E)	CV (%)
Siero pos.	14	12	5.6
	14	37	4.2
Interdosaggio	n	Media (NTU)	CV (%)
Siero pos.	24	0.46	6.9
	20	1.3	7.7

10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica é pari a > 95%.

10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica é pari a >95%.

10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed itterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,2 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni di interferenza nel presente test.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.

11. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze. La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato. Gli anticorpi IgM contro HSV-1 o HSV-2 non danno l'immunità per altre infezioni.

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- Il NovaLisa™ ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

ATTENZIONE: Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.

ATTENZIONE: L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Numero del prodotto: HSV2M0540 HSV-2 (ricombinante) IgM-ELISA (96 determinazioni)

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 serológicos, 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 depósito de germen 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 extracción de nuevas partículas 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 inmunológico. Existe un período de latencia, mientras el genoma del virus se circulariza en forma elíptica, formando solamente unos pocos productos de virus. Diferentes estímulos de carácter endógeno (stress, 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	Vía de transmisión	Síntomas	Complicaciones	Diagnostico
VHS-1 (herpes labial)	gotitas de fluido contaminado	vesículas múltiples en la mucosa oral, fiebre, vesiculitas en la boca o cara, inflamación de nodulos lymphaticos	meningitis, encefalitis, infección neonatal	imagen clinica serología

El virus puede ser detectado por:

- Microscopia: CPE, inmunofluorescencia
- PCR
- Serología: Detección de anticuerpos a través de ELISA

2. USO PREVISTO

El enzimoimmunoensayo (recombinante) de Nova Tec es para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra el virus del Herpes simplex tipo 2 (VHS-2) en suero o plasma (citrato) humano. La utilización de anticuerpos recombinantes IgM posibilita la detección de anticuerpos específicos IgM contra VHS-2 en presencia de anticuerpos contra VHS-2.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimatica cualitativa de anticuerpos específicos contra el VHS-2 se basa en la tecnica del ELISA (Enzym linked Immunosorbent Assay). Las tiras de micropocillos que se usan como fase sólida están recubiertas con antígenos recombinantes específicos del VHS-2. Los anticuerpos existentes en la muestra unen a los antígenos inmovilizados de la placa de microtitulación. El conjugado de anticuerpos IgM anti humano con peroxidasa de rábano, se une con los complejos antígeno-anticuerpo en muestras positivas. Estos complejos inmunológicos desarrollan una coloración azul después de incubarlos con sustrato de tetrametilbenzindina (TMB). Finalmente se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, causando un cambio de coloración de azul a amarillo. La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 450nm.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Microtiras (IgM) recubiertas de antígeno de VHS-2:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígeno recombinante gG2 , en bolsa de aluminio.
- **Diluyente de muestra IgM :** 1 botella de 100ml de solución de tampón para diluir la muestra; contiene IgG anti-humana; pH 7.2 ± 0.2; color verde; listo para el uso; tapón blanco.
- **Solución de parada:** 1 botella de 15ml de ácido sulfúrico, 0.2mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Solución de lavado (20x conc.):** 1 botella de 50ml de una solución de tampón 20x concentrado para lavar los pocillos; pH 7.2 ± 0.2; tapa blanca.
- **Conjugado IgM anti-humano (VHS-2)**:** 1 botella de 20ml de conjugado de anticuerpos IgM anti-humano con peroxidasa; color rojo; tapa negra.
- **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control positivo de IgM (VHS-2)***:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado.
- **Control cut-off de IgM (VHS-2)***:** 1 botella de 3 ml; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado

- **Control negativo de IgM (VHS-2)***:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado.
- * contiene 0.1% de Bronidox L después de diluir
- ** contiene 0.2% Bronidox L
- *** contiene 0.1% Catón

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 soporte
- 1 hoja de instrucciones
- 1 hoja de resultados

4.3. Materiales y instrumentos necesarios

- Fotómetro con filtros de 450/620 nm
- Incubadora/cámara húmeda con termostato
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas con jeringuillas desechables (10, 100, 200, 1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Tubos de plástico desechables
- Gradilla para los tubos
- Agua destilada
- Cronómetro

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

El test tiene que estar almacenado de 2...8°C. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de las botellas y en el exterior.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos, las muestras y los controles tienen que estar a la temperatura ambiente (20...25°C) antes de ser utilizados!

6.1. Tiras reactivas

Las tiras separables recubiertas con antígeno recombinante gG2 del VHS-2 están selladas. Los pocillos listos para ser utilizados tienen que estar almacenados de 2...8°C. *Mantener los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio junto con el desecante y conservar de 2...8°C. El producto se conserva hasta la fecha de caducidad indicada.*

6.2. Conjugado de IgM anti-humano (VHS-2)

La botella contiene 20ml de una solución de IgM anti-humano conjugada con peroxidasa de rábano, tampón, estabilizadores, conservante y un colorante rojo inerte. La solución está lista para ser utilizada y tiene que estar almacenada de 2...8°C. *Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

6.3. Controles

Las botellas contienen de solución de control listas para ser utilizadas. Las soluciones tienen que estar almacenadas de 2...8°C y contienen 0.1% de Catón. *Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

6.4. Tampón de dilución de IgM para la muestra

La botella contiene 100ml de tampón de fosfato, estabilizadores, conservantes y un colorante verde inerte.. se utiliza para la dilución de la muestra del paciente. La solución contiene anticuerpos del tipo IgG anti-humanos para eliminar la inhibición competitiva de los anticuerpos de la clase IgG específicos y para retirar el factor reumatoide. Esta solución lista para ser utilizada ha de almacenarse entre 2...8°C. La solución se usa para diluir las muestras. *Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado entre 2...8°C.*

6.5. Solución para lavar (20x conc.)

La botella contiene 50ml de tampón concentrado, detergentes y conservantes. El contenido se diluye con un litro de agua destilada (1+19). La solución diluida es estable 5 días a temperatura ambiente. *La cristalización en el concentrado desaparece al calentarla a 37°C y mezclarla bien antes de usarla. Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

6.6. Solución de TMB

La botella contiene 15ml de una mezcla de tetrametilbenzidina con peróxido de hidrógeno. La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C protegida de la luz. *La solución es levemente azulada. En caso de contaminación cambia a una coloración azul más intensa no pudiendo ser utilizada en el ensayo.*

6.7. Solución de parada

La botella contiene 15ml de 0.2 M de ácido sulfúrico (R36/38, S26). La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C. Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8°C, en caso contrario hay que congelarlas (-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. 10µl de la muestra con 1ml de tampón, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido para el método manual. Para excluir efectos de lavado en caso de utilizar los automáticos ELISA elevas el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de solución de lavado de 300 µl a 350 µl. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los controles en la hoja de resultados suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos en el soporte.

En este caso por lo menos

1 pocillo	(e.G. A1)	para el blanco,
1 pocillo	(e.G. B1)	para el control negativo
2 pocillos	(e.G. C1+D1)	para el Cut-off
1 pocillo	(e.G. E1)	para el control positivo

Para mayor seguridad es necesario hacer doble ensayo de controles y muestras del paciente.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

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

Graduar la incubadora a 37 ± 1°C

1. Pipetear 100 µl de 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 h ± 5 min a 37°C**.
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300µl de la solución de lavado. Evita el rebosamiento de los pocillos. El tiempo entre cada lavado y cada aspiración tiene que ser por lo menos de 5 segundos. Para sacar el resto del líquido de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.

Ojo: El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y resultados errónamente aumentados!

5. Pipetar 100µl de conjugado anti-IgM VHS-2 en cada pocillo con excepción del blanco. Cubrir con una lámina adhesiva.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25°C)**. Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetar 100µl de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 C)**.
10. Pipetear en todos los pocillos 100µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el sustrato de TMB. *Toda coloración azul formada durante la incubación se convierte en amarilla.*

Nota: Muestras que son altamente positivas pueden causar precipitados negros del cromógeno! Estos precipitados influyen en los valores de las mediciones. Se recomienda diluir las muestras del paciente con solución salina 1+1. Después, preparar la muestra diluida con el tampón de dilución para la prueba de IgM 1+100. En este caso, el resultado se multiplica por 2.

11. Medir la extinción de la solución en cada pocillo con 450/620nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

8.2. Medición

Efectuar con ayuda del blanco en el pocillo **A1** la **calibración al cero** del fotómetro (lector de ELISA).

Para obtener resultados correctos, si la calibración no es posible por causas técnicas, hay que sustraer el valor de la extinción de la posición A1 del resto de los valores de extinción!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450nm** y anotar los resultados de los controles y de las muestras en la hoja de resultados.

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

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

9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco** en A1 extinción < **0.100**
- **Control negativo** en B1 extinción < **0.200 y < cut-off**
- **Control cut-off** en C1 y D1 extinción **0,150 – 1,30**
- **Control positivo** en E1 extinción >**cut-off**

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

9.2. Calculo 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 OD Cut-off Control + 0,44 OD Cut-off Control = 0,86:2 = 0,43

$$\text{Cut-off} = \underline{0,43}$$

9.3. Interpretación de los resultados

Las muestras se consideran positivas cuando el valor de la extinción es como mínimo mayor al 10% del valor del *cut-off*.

Las muestras con valores de extinción $\pm 10\%$ del *cut-off* no pueden ser consideradas claramente positivas o negativas → **Zona intermedia**

Se recomienda entonces repetir el ensayo con nuevas muestras del paciente de 2 a 4 semanas más tarde. Si de nuevo se encuentran resultados en la zona intermedia, la muestra tiene que estar valorada como **negativa**.

Las muestras se consideran **negativas** si el valor de la extinción esta por lo menos un 10% por debajo del *cut-off*.

9.3.1. Resultados en unidades Nova Tec [NTU]

Promedio de la extinción de la muestra x 10 = [NovaTec-unidades = NTU]
Cut-Off

Ejemplo: $\frac{1.782 \times 10}{0.33} = 54 \text{ NTU (NovaTec Unidades)}$

Cut-Off:	10	NTU
Zona intermedia:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1. Precisión

Inter ensayo	n	Promedio	CV (%)
Serum pos.	14	12	5.6
	14	37	4.2
Intra ensayo	n	Promedio	CV (%)
Serum pos.	24	0.46	6.9
	20	1.3	7.7

10.2. Especificidad del ensayo

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia de la sustancia a analizar específicamente. Ascende al >95 %.

10.3. Sensibilidad del ensayo

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Ascende al >95 %.

10.4. Interferencias

Las muestras hemolítico, lipémicas e ictericas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 10 mg/ml para hemoglobina, 5 mg/ml para triglicéridos y de 0,2 mg/ml para bilirrubina.

10.5. Reactividad cruzada

Serum	Infección acuidad	NovaTec Elisa HSV-2 IgM
1	Adenovirus	neg.
3	CMV	neg.
8	EBV	neg.
9	Equinococcus	neg.
12	HBV	neg.
17	Influenza A	neg.
18	Influenza B	neg.
22	Leptospira	neg.
23	M. pneumoniae	neg.
26	Picorna	neg.
27	Q-Fever	neg.
29	Rubella	neg.
32	Toxoplasma	neg.
34	VZV	neg.

Los resultados están basados en pruebas de ensayos querales: No se trata de especificaciones garantizadas.

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.

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 personas inmunodeprimidas o en neonatos. La presencia de anticuerpos IgM contra VHS-1 o VHS-2 no asegura inmunidad para infecciones posteriores.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, 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 componentes de origen humano han sido examinados y resultaron **no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG**. No obstante, todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo 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 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.
- Pipetear **cuidadosamente** las muestras y el conjugado en los pocillos para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados.
- El NovaLisa™ ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

ADVERTENCIA: Bronidox L, en la concentración utilizada, casi no muestra riesgos tóxicos en la piel y en las mucosas.

ADVERTENCIA: El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel! En caso de contacto con los ojos lavar abundantemente con agua y consultar a un médico.

12.1. 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.

13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

N° del producto: HSV2M0540 HSV-2 IgM ELISA recombinante (96 determinaciones)

1. INTRODUÇÃO

O vírus do herpes simplex é um vírus com ADN em envelope (150-200 nm de diâmetro) pertencente ao grupo alfa-herpesviridae. Baseando-se em diferenças antigénicas, biológicas e bioquímicas, pode dividir-se em dois serótipos: HSV-1 e HSV-2. O homem é o único hospedeiro natural e fonte do vírus conhecido. O HSV Tipo 1 causa tipicamente herpes labial, enquanto o HSV-tipo 2 afecta tipicamente a área genital. A maior parte das vezes, o HSV-1 e HSV-2 estão inactivos ou silenciosos e não apresentam sintomas, mas algumas pessoas infectadas têm erupções de borbulhas e úlceras. Uma vez infectado com o HSV, as pessoas permanecem para sempre infectadas. Os vírus Herpes simplex estão entre os agentes infecciosos mais comuns no homem, e qualquer um dos tipos HSV parecem ser capazes de infectar partes do corpo similares. Uma grande percentagem da população adulta é seropositiva (aprox. 90% HSV-1, dependendo do status sócio-económico 10-30% HSV-2). A infecção primária de HSV-1 ocorre, normalmente, na infância (6 aos 18 meses de idade). O HSV-2 produz normalmente sintomas leves, e a maioria das pessoas não tem sintomas que se reconheçam. Pessoas de risco são as crianças que herdaram células T deficientes e pacientes que são imunossuprimidos devido a infecções (e.g. HIV), transplante ou terapia de cancro.

O HSV-2 pode causar infecções potencialmente fatais em crianças se a mãe na altura do parto passar o vírus. O HSV-2 tem um papel importante na contaminação heterossexual por HIV: o herpes pode tornar as pessoas mais susceptíveis à infecção por HIV, e nos indivíduos infectados por HIV pode ser ainda mais infeccioso.

Espécies	Doença	Sintomas	Mecanismo de infecção
HSV-2 (Herpes Genital)	Herpes Genital Herpes neonatal	Lesões que se curam por si próprias, sintomas iguais aos da gripe (febre, glândulas inchadas), Úlceras	Doença sexualmente transmissível (STD)

- A presença da infecção pelo vírus pode ser identificada por
- Microscopia: CPE, IF
- PCR
- Serologia: detecção de anticorpos por ELISA

2. USO PREVISTO

O NovaTec HSV 2 recombinante IgM ELISA permite a detecção da infecção por HSV 2 na presença de anticorpos para o HSV 1 no soro ou plasma humano (citrato).

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

A determinação imunoenzimática qualitativa de anticorpos da classe IgM contra o HSV Tipo 2 baseia-se na técnica ELISA (imunoenensaio enzimático).

Os poços das tiras da microplaca estão recobertos com antígenos recombinantes HSV Tipo 2 para se ligarem aos anticorpos correspondentes da amostra. Após lavar os poços para remover todo o material de amostra não ligado, é adicionado conjugado anti-IgM humano marcado com peroxidase de rábano (HRP). Este conjugado liga-se aos anticorpos específicos HSV Tipo 2 capturados. O complexo imunológico formado pelo conjugado ligado é visualizado adicionando substrato Tetrametilbenzidina (TMB) que lhe dá uma coloração azulada. A intensidade deste produto é proporcional á quantidade de anticorpos IgM específicos do HSV Tipo 2 na amostra. É adicionado ácido sulfúrico para parar a reacção, causando uma coloração final amarela. Uma absorvância a 450 nm é lida com um leitor de microplacas ELISA.

4. MATERIAIS

4.1. Reagentes fornecidos

- **HSV Tipo 2 poços revestidos (IgM):** 12 tiras de 8 poços separáveis, revestidas com antígeno recombinante gG2do HSV Tipo 2; em bolsa de alumínio com fecho.
- **Diluyente de amostra IgM ***:** 1 Frasco, contendo 100 ml de solução de tampão para diluição da amostra; pH 7.2 ± 0.2; cor verde; pronto a usar; tampa branca.
- **Solução Stop:** 1 Frasco, contendo 15 ml ácido sulfúrico, 0.2 mol/l; pronto a usar; tampa vermelha.
- **Solução de lavagem (20x conc.)*:** 1 Frasco, contendo 50 ml de uma solução de tampão concentrado 20 vezes (pH 7.2 ± 0.2) para lavar os poços; tampa branca.
- **Conjugado anti-IgM HSV Tipo 2***:** 1 Frasco contendo 20 ml de peroxidase marcada anticorpo anti- IgM humano; cor vermelha, pronto a usar; tampa preta.
- **Solução de substrato TMB:** 1 Frasco, contendo 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB); pronto a usar; tampa amarela.
- **Controlo positivo IgM HSV Tipo 2***:** 1 Frasco, contendo 2 ml; cor amarelo; pronto a usar; tampa vermelha.
- **Controlo cut-off IgM HSV Tipo 2***:** 1 Frasco, contendo 3 ml; cor amarelo; pronto a usar; tampa verde.
- **Controlo negativo IgM HSV Tipo 2***:** 1 Frasco, contendo 2 ml; cor amarelo; pronto a usar; tampa azul.

- * Contém 0.1 % Bronidox L após diluição
- ** Contém 0.2 % Bronidox L
- *** Contém 0.1 % Kathon

4.2. Materiais fornecidos

- 1 Suporte de tiras
- 1 Películas adesivas
- 1 Instruções de utilização
- 1 Plano de identificação e distribuição

4.3. Materiais e equipamento requerido

- Leitor de microplacas ELISA, equipado para a medição da absorvância a 450/620 nm
- Incubador 37°C
- Equipamento manual ou automático para lavar os poços
- Pipetas para distribuir volumes entre 10 a 1000 µl
- Misturadora de tubos Vortex
- Água desionizada ou água destilada recentemente
- Tubos descartáveis
- Cronómetro

5. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

Os reagentes são estáveis até à data de validade indicada no rótulo, quando armazenados a uma temperatura de 2...8 °C.

6. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Todos os reagentes, amostras e controlos têm que estar à temperatura ambiente (20...25°C) antes de se iniciar o teste!

6.1. Tiras separáveis revestidas

As tiras separáveis prontas a usar estão revestidas com antigénio recombinante HSV Tipo 2. Armazene a 2...8 °C. *Após ter retirado as tiras que precisa, deve selar imediatamente as restantes tiras na bolsa de alumínio, juntamente com o dessecante fornecido e guardá-las a uma temperatura de 2...8 °C; o produto é estável até à data de validade.*

6.2. Conjugado anti-IgM HSV Tipo 2

O frasco contém 20 ml de uma solução com peroxidase de rábano e anti-IgG humana, tampão, estabilizantes, conservantes e um corante vermelho inerte. A solução está pronta a usar. *Armazene a 2...8°C. Depois da primeira abertura, o produto conserva-se até á data de validade se armazenado a uma temperatura de 2...8°C.*

6.3. Controlos

Os frascos marcados controlo positivo, Cut-off e controlo negativo contém uma solução de controlo pronta a ser utilizada. Contém 0.1% de Kathon e tem que ser armazenada a uma temperatura de 2...8°C.. *Depois da primeira abertura, o produto conserva-se até á data de validade se armazenado a uma temperatura de 2...8°C.*

6.4. Diluente de amostra IgM

O frasco contém 100 ml de tampão de fosfato, IgG anti-humana, estabilizantes, conservantes e corante verde inerte. É usado para a diluição da amostra do paciente. Esta solução contém anticorpos anti-humanos da classe IgG para eliminar a inibição competitiva dos anticorpos específicos da classe IgG para remover o factor reumatóide. Esta solução pronta a usar tem que ser armazenada a uma temperatura de 2...8°C. *Depois da primeira abertura, o produto conserva-se até á data de validade se armazenado a uma temperatura de 2...8°C.*

6.5. Solução de lavagem (20x conc.)

O frasco contém 50 ml de um tampão concentrado, detergentes e conservantes. Dilua a solução de lavagem 1+19; e.g. 10 ml solução de lavagem + 190 ml de água bidestilada fresca e livre de germes. O tampão diluído é estável durante 5 dias a uma temperatura ambiente. *Cristais da solução desaparecem aquecendo até uma temperatura de 37 °C num banho-maria. Depois da primeira abertura, o produto conserva-se até á data de validade.*

6.6. Solução de substrato TMB

O frasco contém 15 ml de uma mistura de peróxido de hidrogénio e de tetrametilbenzidina. O reagente está pronto a usar e tem que ser armazenado a uma temperatura de 2...8°C, longe da luz solar. *A solução deverá ser incolor ou poderá ter um leve tom azulado. Se o substrato ficar azul, pode ter sido contaminado e deve ser deitado fora. Depois da primeira abertura, o produto conserva-se estável até á data de validade se armazenado a uma temperatura de 2...8°C.*

6.7. Solução Stop

O frasco contém 15 ml de uma solução de ácido sulfúrico 0.2 M (R 36/38, S 26). Esta solução pronta a usar tem que ser armazenada a uma temperatura de 2...8°C. *Depois da primeira abertura, o produto conserva-se estável até á data de validade.*

7. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Use amostras de soro ou plasma humano (citrato) com este ensaio. Se o ensaio se realizar dentro de 5 dias após a recolha da amostra, o espécime deve ser guardado a uma temperatura de 2...8°C; caso contrário, deverá ser aliqotado e congelado (-20 to -70°C). Se as amostras forem armazenadas congeladas, misture bem as amostras descongeladas antes de testá-las. *Evite ciclos repetidos de congelamentos e descongelamentos.*

Inactivação a quente das amostras não é recomendado.

7.1. Diluição das amostras

Antes dos ensaios, todas as amostras devem ser diluídas 1+100 com diluente de amostra IgM. Dispense 10µl de amostra e 1 ml de diluente de amostra IgM para dentro dos tubos para obter uma diluição 1+100 e misture com um Vortex.

8. PROCEDIMENTO DE ENSAIO

8.1. Preparação do Teste

Por favor leia atentamente o protocolo do teste **antes** de efectuar o ensaio. A fiabilidade dos resultados depende da adesão precisa ao protocolo de teste. O procedimento de teste que se segue é válido para procedimentos manuais. Se efectuar o teste nos sistemas automáticos ELISA recomendamos que aumente os passos de lavagem de três para cinco, e o volume da solução de lavagem de 300µl para 350µl para evitar efeitos de lavagem. Antes de começar o ensaio, o plano de distribuição e identificação para todas as amostras deve ser cuidadosamente estabelecido na folha de resultados fornecida neste kit. Seleccione o número necessário de tiras ou poços e insira-as no suporte.

Por favor reserve pelo menos:

1 poço	(e.g. A1)	para o branco do substrato,
1 poço	(e.g. B1)	para o controlo negativo,
2 poços	(e.g. C1+D1)	para o controlo de cut-off e
1 poço	(e.g. E1)	para o controlo positivo.

Recomendamos que determine os controlos e as amostras dos pacientes em duplicado se necessário.

Efectue todos os passos do ensaio na ordem descrita e sem atrasos entre os passos.

Deve usar uma ponta limpa e descartável para dispensar cada amostra e cada controlo.

Ajuste o incubador para 37° ± 1°C.

1. Dispense 100µl de controlos e amostras diluídas nos seus respectivos poços. Deixe o poço A1 para o branco do substrato.
2. Tape os poços com a película fornecida no kit.
3. **Incube durante 1 hora ± 5 min a 37±1°C.**
4. Quando terminar a incubação, remova a película, aspire o conteúdo dos poços e lave cada poço três vezes com 300µl de Solução de Lavagem. Evite o transbordo dos poços de reacção. O tempo entre cada ciclo de lavagem tem que ser >5 seg. No final, remova cuidadosamente o fluido remanescente batendo nas tiras num papel absorvente antes de prosseguir para o próximo passo!

Nota: A lavagem é muito importante! Lavagem insuficiente resulta numa fraca precisão e a valores de absorvância falsamente elevados.

5. Dispense 100µl de conjugado anti-IgM HSV Tipo 2 em todos os poços excepto no poço em branco (e.g. A1). Tape com película.
6. **Incube durante 30 min a temperatura ambiente. Não exponha à luz directa do sol.**
7. Repita o passo 4
8. Dispense 100µl de solução de substrato TMB em todos os poços
9. **Incube durante exactamente 15 min a temperatura ambiente, no escuro.**
10. Dispense 100µl de Solução Stop em todos os poços na mesma ordem e à mesma velocidade usada para a solução de substrato TMB.

A cor azul desenvolvida durante a incubação passa a amarela.

Nota: Amostras de pacientes altamente positivas podem causar precipitados escuros no cromogénio! Estes precipitados influenciam a leitura da densidade óptica. Recomendamos a pré-diluição da amostra com uma solução cloreto de sódio fisiológico, por exemplo 1+1. Depois dilua a amostra 1+100 com tampão de diluição e multiplique os resultados em NTU por 2.

11. Meça a absorvância da amostra a 450/620 nm dentro de 30 min após a adição da solução Stop.

8.2. Medição

Ajuste o leitor de microplacas ELISA para zero usando o **branco do substrato do poço A1**.

Se – devido a razões técnicas – o leitor ELISA não puder ser ajustado para zero usando o branco do substrato do poço A1, subtrair o valor de absorvância do poço A1 a todos os outros valores de absorvância medidos, para obter resultados fiáveis!

Meça a absorvância de todos os poços a **450 nm** e registre os valores de absorvância para cada controlo e amostra de paciente no plano de distribuição e identificação.

Uma leitura do segundo comprimento de onda empregando 620 nm como comprimento de onda de referência é aconselhada.

Quando for aplicável, calcule os **valores médios das absorvâncias** de todos os duplicados.

9. RESULTADOS

9.1. Critérios de validação da corrida

Para que um ensaio seja considerado válido, tem que cumprir os seguintes critérios:

- **Branco do Substrato** em A1: Valor de absorvância **menor do que 0.100**.
- **Controlo negativo** em B1: Valor de absorvância **menor do que 0.200 e menor do que cut-off**
- **Controlo de Cut-off** em C1 e D1: Valor de absorvância **entre 0.150 e 1.300**.
- **Controlo positivo** em E1: Valor de absorvância **maior do que o valor de cut-off**.

Se estes critérios não forem cumpridos, o teste não é válido e tem que ser repetido.

9.2. Cálculo dos resultados

O cut-off é o valor médio de absorvância das determinações do controlo Cut-off.

Exemplo: valor de absorvância do controlo Cut-off 0.39 + valor de absorvância do controlo Cut-off 0.37 = 0.76 / 2 = 0.38

$$\text{Cut-off} = 0.38$$

9.3. Interpretação dos resultados

As amostras são consideradas **POSITIVAS** se o valor de absorvância for maior do que 10% acima do cut-off.

Amostras com um valor de absorvância de 10% acima ou abaixo do cut-off não devem ser consideradas como claramente positivas ou negativas

→ **zona cinzenta**

Recomendamos que repita novamente o teste 2 - 4 semanas mais tarde com uma amostra fresca. Se os resultados do segundo teste ficarem novamente na zona cinzenta a amostra tem que ser considerada **NEGATIVA**.

As amostras são consideradas **NEGATIVAS** se o valor de absorvância for menor do que 10% abaixo do cut-off.

9.3.1. Resultados em unidades de NovaTec

$$\frac{\text{Paciente (média) valor de absorvância} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Unidades NovaTec} = \text{NTU}]$$

Exemplo: $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (Unidades NovaTec)}$

Cut-off:	10	NTU
Zona cinzenta:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo	>11	NTU

10. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DO DESEMPENHO

10.1. Precisão

Inter-ensaio	n	Média	Cv (%)
Pos. Soro	14	12	5.6
	14	37	4.2
Intra-ensaio	n	Média	Cv (%)
Pos. Soro	24	0.46	6.9
	20	1.3	7.7

10.2. Especificidade do diagnóstico

A especificidade do diagnóstico é definida como a probabilidade de se obter um resultado negativo na ausência do analito específico. É de >95%.

10.3. Sensibilidade do diagnóstico

A sensibilidade do diagnóstico é definida como a probabilidade de se obter um resultado positivo na presença do analito específico. É de >95 %.

10.4. Interferências

Nenhuma interferência foi observada em soro hemolítico, lipémico ou icterico para concentrações que vão até 10 mg/ml de hemoglobina, 5 mg/ml de triglicérides e 0.2 mg/ml de bilirubinas.

Nota: Os resultados referem-se aos grupos de amostras investigadas; Estas não são especificações garantidas.

10.5. Reactividade Cruzada

Soro	Infecção Aguda	NovaTec Elisa HSV-2 IgM
1	Adenovirus	neg.
3	CMV	neg.
8	EBV	neg.
9	Echinococcus	neg.
12	HBV	neg.
17	Influenza A	neg.
18	Influenza B	neg.
22	Leptospira	neg.
23	M. pneumoniae	neg.
26	Picorna	neg.
27	Q-Fever	neg.
29	Rubella	neg.
32	Toxoplasm.	neg.
34	VZV	neg.

11. LIMITES DO PROCEDIMENTO

Contaminações bacterianas ou ciclos de congelamento/descongelamento repetidos da amostra podem afectar os valores de absorvância. O diagnóstico de uma doença infecciosa não deve ser estabelecido baseando no resultado de um teste apenas. Um diagnóstico preciso deve levar em consideração a história clínica, sintomatologia assim como dados serológicos.

Em pacientes imunocomprometidos e recém-nascidos os dados serológicos têm apenas valor restrito.

12. PRECAUÇÕES E AVISOS

- De acordo com o artigo 1 parágrafo 2b da Directiva Europeia 98/79/EC o uso de dispositivos médicos de diagnóstico in vitro é destinado pelo fabricante para a garantir a aplicabilidade, o desempenho e a segurança do produto. Por isso, os procedimentos de teste, a informação, as precauções e avisos, constantes nas instruções de uso têm que ser rigorosamente seguidas. O uso destes kits de teste em analisadores e equipamentos similares tem que ser validada. Quaisquer mudanças na concepção, composição e procedimento de teste, assim como outro uso qualquer em combinação com outros produtos não aprovados pelo fabricante, não é autorizada. Apenas o utilizador é o responsável por essas mudanças. O fabricante não é responsável por resultados falsos e incidentes relacionados com estas razões. O fabricante não é responsável por quaisquer resultados por análise visual das amostras dos pacientes.
- Apenas para uso em diagnóstico in vitro.
- Todos os componentes de origem humana usados na produção destes reagentes foram testados para anticorpos anti-HIV, anticorpos anti-HCV e HBsAg e foram considerados não reactivos. No entanto, todos os materiais devem ainda assim, ser considerados como potencialmente perigosos e manuseados como tal.
- Não troque reagentes e tiras de diferentes lotes de produtos.
- Não deve usar reagentes de outros fabricantes Com os reagentes deste kit de teste.
- Não use os reagentes após a data de validade indicada no rótulo.
- Use apenas pontas de pipetas, dispensadores e material de laboratório limpos.
- Não troque as tampas dos frascos de reagentes para evitar contaminação entre eles.
- Feche os frascos de reagente muito bem depois de usar para evitar evaporação e contaminação microbiana.
- Após a primeira abertura e subsequente armazenamento, verifique se os conjugados e controlos não foram contaminados antes de voltar a usá-los.
- Para evitar contaminação entre eles e resultados elevados falsos, pipete as amostras dos pacientes e dispense o conjugado sem salpicar e de forma precisa no fundo dos poços.
- O NovaLisa™ ELISA foi concebido para pessoal qualificado, familiarizado com as boas práticas laboratoriais.

- AVISO: Na concentração usada o Bronidox L não representa nenhum risco toxicológico após contacto com a pele e membranas mucosas!
- AVISO: O ácido sulfúrico irrita os olhos e a pele. Não deixe ao alcance das crianças. Após contacto com os olhos, lave imediatamente com água e consulte um médico!

12.1. Considerações de eliminação

Os resíduos dos químicos e preparações são normalmente considerados como resíduos perigosos. A eliminação deste tipo de resíduos é regulada através de leis e regulamentações nacionais e regionais. Contacte as autoridades locais ou empresas de gestão de resíduos que lhe darão conselhos acerca de como eliminar os resíduos perigosos.

13. INFORMAÇÃO PARA ENCOMENDAS

Prod. N°.: HSV2M0540 HSV Tipo 2 recombinante gG2 IgM- ELISA (96 Determinações)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA






Corey, L.; P.G. Spear: Infections with herpes simplex viruses. N. Engl. J. Med. 314 (1986) 686-691

Dörries, R., R. Kaiser, H. Imrich et al.: Neuere Aspekte zur Diagnose zentralnervöser Virusinfektionen. Lab. Med. 15 (1991) 99-102

Felgenhauer, K.: Diagnostische Bedeutung der lokal synthetisierten spezifischen Antikörper des Liquor cerebrospinalis. Lab. Med. 15 (1991) 208

Kaufmann, H.E.;F. Martola and C. Dohlman: The use of 5-iodo-2'-deoxy-uridine (IDU) in the treatment of herpes simplex keratitis. Arch. Ophthal. N. Y. 68 (1962) 235-239

Spaar, F.-W.: Die menschliche Herpes simplex Enzephalitis und –Meningitis. Eine klinisch-neurologische Untersuchung. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1976)

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles/ Legenda/ Símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro/ Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
LOT	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote/ Número do Lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de Validade
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento/ Temperatura de Armazenamento
CE	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ Marca CE/ Marca CE
[REF]	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo/ Referência de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso/ Consultar as Instruções de Utilização
MTP	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca/ Microplaca
CONJ	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado/ Conjugado
CONTROL -	Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ Sérum de contrôle négatif/ siero di controllo, negativo /Suero control negativo/ Soro de controle negativo
CONTROL +	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérum de contrôle positif/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo / Soro de controle positivo
CUT OFF	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérum de contrôle du cut-off/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off / Soro de controle Cut-off
DIL M	Sample diluent buffer IgM/ IgM-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgM/ soluzione tampone per i campioni IgM/ solución tampón para muestras IgM/ Solução de tampão IgM para amostras
SOLN STOP	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante/ Solución de parada/ Solução de bloqueio
SUB TMB	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solción substrato TMB/ Solução substrato TMB
WASHBUF 20x	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Tampon de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20/ Solução de lavagem concentrado 20x
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenuto sufficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests/ Conteúdo suficiente para "n" testes

SCHEME OF THE ASSAY

HSV Type 2 recombinant gG2 IgM-ELISA

Test Preparation

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

Assay Procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative control	Positive control	Cut-off control	Sample (diluted 1+100)
Negative control	-	100µl	-	-	-
Positive control	-	-	100µl	-	-
Cut-off control	-	-	-	100µl	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300µl of washing solution					
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300µl of washing solution					
TMB Substrate	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark					
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629

Email : info@NovaTec-ID.com

Internet: www.NovaTec-ID.com

HSV2M0540engl,dt,fr,it,es,port31082011-CS