

RIDASCREEN[®] HSV 1+2 IgG, IgM

Art. n°: K5021 (IgG)
K5031 (IgM)



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemania
Telf.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Área de aplicación

Para el diagnóstico *in vitro*. Los tests RIDASCREEN® HSV 1+2 son enzimoimmunoensayos (EIA) para la identificación semicuantitativa de anticuerpos IgG o IgM contra los virus Herpes simplex tipos 1 y 2 (HSV 1, HSV 2) en suero humano. Los tests están basados en un antígeno completo y se emplean para el cribado de anticuerpos contra el HSV.

2. Resumen y explicación del test

Después de una infección con el HSV el sistema inmune reacciona con la producción de anticuerpos específicos contra el agente patógeno. Estos agentes se pueden detectar en el suero con ayuda de procedimientos inmunológicos. Para el valor informativo del test es importante, además de la selección del antígeno específico contra el agente patógeno, también el método de análisis empleado. En base a la posibilidad de diferenciación de las distintas clases de inmunoglobulinas en el enzimoimmunoensayo, en comparación con otros métodos serológicos (por ej. IHI o KBR), se pueden obtener con este test informaciones exactas sobre el estatus inmunológico de un paciente.

3. Fundamento del test

Los antígenos purificados se encuentran unidos a la microplaca de titulación. Los anticuerpos presentes en muestras de suero de los pacientes se enlazan a los antígenos y son detectados en un segundo paso mediante un anticuerpo antihumano marcado con una enzima (conjugado). La enzima convierte el sustrato incoloro (H_2O_2/TMB) en un producto final azul. La reacción enzimática se termina mediante la adición de ácido sulfúrico. Así ocurre también de forma simultánea un cambio de color del azul al amarillo. Acto seguido se realiza la determinación en un fotómetro a 450 nm (longitud de onda de referencia ≥ 620 nm).

4. Contenido del envase

Tabla 1: Contenido del envase (Los reactivos de un envase alcanzan para 96 determinaciones)

			K5021 IgG	K5031 IgM
Plate	96 determ.	Microplaca de titulación; 12 tiras de microtitulación (separables) en marco de soporte; recubiertas con antígeno completo de HSV	X	X
SeroPP	110 ml	Buffer de muestras, listo para el uso; solución de NaCl tamponada con buffer de fosfato, teñida de amarillo; contiene Timerosal al 0,01% y Tween 20 al 0,05%	X	X
SeroWP	100 ml	Buffer de lavado, concentrado 10 veces; solución de NaCl tamponada con buffer de Tris, contiene Bronidox-L al 0,2% y Tween 20 al 0,5%	X	X
Control IgG + <i>tapa verde</i>	2,5 ml	Estándar de control IgG, listo para el uso; suero humano diluido, teñido de verde; contiene Timerosal al 0,01% y Tween 20 al 0,05%	X	
Control IgM + <i>tapa roja</i>	2,5 ml	Estándar de control IgM, listo para el uso; suero humano diluido, teñido de rojo; contiene Timerosal al 0,01% y Tween 20 al 0,05%		X
Control IgG - <i>tapa incolora</i>	1,2 ml	Control negativo IgG, listo para el uso; suero humano diluido; contiene Timerosal al 0,01% y Tween 20 al 0,05%	X	
Control IgM - <i>tapa incolora</i>	1,2 ml	Control negativo IgM, listo para el uso; suero humano diluido; contiene Timerosal al 0,01% y Tween 20 al 0,05%		X
Control IgG A <i>tapa verde</i>	1,2 ml	Control A IgG, listo para el uso; suero humano diluido; contiene Timerosal al 0,01 % y Tween 20 al 0,05%	X	
Control IgG B <i>tapa verde</i>	1,2 ml	Control B IgG, listo para el uso; suero humano diluido; contiene Timerosal al 0,01 % y Tween 20 al 0,05%	X	
Control IgM A <i>tapa roja</i>	1,2 ml	Control A IgM, listo para el uso; suero humano diluido; contiene Timerosal al 0,01 % y Tween 20 al 0,05%		X
Control IgM B <i>tapa roja</i>	1,2 ml	Control B IgM, listo para el uso; suero humano diluido; contiene Timerosal al 0,01 % y Tween 20 al 0,05%		X
SeroG LD <i>tapa verde</i>	12 ml	Conjugado antihumano IgG (cabra), listo para el uso; Anticuerpos conjugados con peroxidasa, en solución estabilizada de proteína; contiene 10 ppm de Proclin, Metilisotiazolona al 0,01%, y Bromonitrodioxano al 0,01%	X	
SeroM LD <i>tapa roja</i>	12 ml	Conjugado antihumano IgM (cabra), listo para el uso; Anticuerpos conjugados con peroxidasa, en solución estabilizada de proteína; contiene 10 ppm de Proclin, Metilisotiazolona al 0,01%, y Bromonitrodioxano al 0,01%		X
SeroSC	12 ml	Sustrato H ₂ O ₂ /Tetrametilbenzidina; listo para el uso	X	X

SeroStop	12 ml	Reactivo de parada 1 N de ácido sulfúrico, listo para el uso	X	X
----------	-------	---	---	---

5. Reactivos y su almacenamiento

Este Kit, almacenado a una temperatura entre 2° y 8 °C, puede ser utilizado hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. : El buffer de lavado diluido se puede conservar 4 semanas si se mantiene a 2 – 8 °C, o una semana a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Después de la fecha de caducidad no se asume ninguna garantía de calidad.

La bolsa de aluminio donde viene la microplaca se debe abrir de manera que el cierre a presión no sea eliminado. Las tiras de microtitulación no usadas se deben guardar de inmediato en la bolsa de aluminio cerrada y a temperaturas de 2 - 8 °C.

Se debe evitar la contaminación de los reactivos al igual que la incidencia directa de luz sobre el sustrato incoloro.

6. Reactivos adicionales necesarios – accesorios requeridos

6.1. Reactivos

- Agua destilada o desionizada

6.2. Accesorios

- Estufa a 37°C
- Tubos de muestra
- Agitador Vortex
- Micropipetas para volúmenes de 10 - 100 µl y 100 - 1000 µl
- Probeta (1000 ml)
- Cronómetro
- Instrumento de lavado para las microplacas de titulación o pipeta multicanal
- Fotómetro para microplacas de titulación (450 nm, filtro de referencia ≥ 620 nm)
- Papel de filtro (paños de laboratorio)
- Recipiente de desechos con una solución de hipoclorito al 0,5%

7. Medidas de seguridad

Sólo para el diagnóstico *in vitro*.

Este test debe ser realizado solamente por personal calificado de laboratorio. Se deben observar las líneas directivas de trabajo para laboratorios médicos. Las instrucciones para el uso del test deben cumplirse estrictamente.

No se debe pipetear las muestras o reactivos con la boca, así como también evitar el contacto con piel lesionada o mucosas. Durante el trabajo con las muestras deben usarse guantes desechables y lavar las manos después del test. En los locales donde se trabaje con las muestras o reactivos de prueba no está permitido fumar, comer o beber.

Los sueros de control del kit (controles estándar y negativo, control A y control B) fueron verificados y no contienen anticuerpos VIH ni HCV así como tampoco HBSAg. No obstante Ud. debe considerarlos, al igual que las muestras de pacientes y otros materiales con los cuales entre en contacto, como potencialmente infecciosos y manejarlos en correspondencia con las regulaciones de seguridad nacionales.

El control estándar y el control negativo, el control A y el control B, así como el buffer de muestras contienen Timerosal al 0,01% como agente conservante. Se debe evitar por tanto el contacto con la piel o mucosas.

El buffer de lavado contiene Bronidox-L al 0,2% como agente conservante. Se debe evitar por tanto el contacto con la piel o mucosas.

El H₂O₂ (sustrato) puede provocar efectos cáusticos sobre la piel. ¡Manejar con cuidado!

El reactivo de parada contiene una solución 1 N de ácido sulfúrico ¡Evitar el contacto con la piel o ropa! Si se produce contacto con la piel debe enjuagarse con agua.

Todos los materiales y reactivos que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas se requiere que sean tratados con agentes desinfectantes adecuados o se sometan a autoclave por lo menos una hora a 121 °C. ATENCIÓN: Para evitar la formación de gases venenosos deben neutralizarse los residuos líquidos que contengan reactivo de parada, antes de echarlos a la solución de hipoclorito.

8. Recolección y conservación de las muestras

El test fue desarrollado para el examen de muestras de suero humano. Después de la extracción de sangre se debe separar el suero lo antes posible de los coágulos para evitar la hemólisis. Las muestras se deben guardar en frío o congeladas hasta que se realice el test. Evite por todos los medios congelar y descongelar el suero varias veces, así como su contaminación microbiana. El empleo de muestras inactivadas por el calor, lipémicas, hemolíticas, ictéricas o turbias puede conducir a resultados falsos.

Tabla 2: Conservación de las muestras

Suero sin diluir		Suero diluido
2 - 8 °C	-20 °C	2 - 8 °C
1 semana	> 1 semana	7 horas

9. Realización del test

9.1. Generalidades

Antes de su uso se deben llevar todos los reactivos y las tiras de microtitulación a la temperatura ambiente (20 - 25 °C). Las tiras de microtitulación no se deben sacar de la bolsa de aluminio hasta que no hayan alcanzado la temperatura del ambiente. Los reactivos se deben mezclar bien inmediatamente antes de su empleo. Después de su uso se debe conservar inmediatamente el kit de prueba a la misma temperatura de 2 - 8 °C.

Se debe extraer solamente tanta cantidad de reactivo como sea necesaria para la realización del test. Las cantidades sobrantes de reactivo no se deben retornar a los frascos, ya que esto puede provocar una contaminación.

Las tiras de microtitulación sólo pueden ser utilizadas una vez. Los reactivos y las tiras de microtitulación no se deben usar cuando el envase esté dañado o los recipientes hayan perdido su hermeticidad.

Algunos de los reactivos contenidos en el kit no son específicos del test. Los reactivos señalizados con el prefijo Sero (por ej. **SeroPP**) se pueden utilizar también en otros tests RIDASCREEN® Sero EIA.

Los sueros de control son específicos de cada lote. No está permitido intercambiar o combinar componentes de kits de distintos lotes.

Los controles A y B de RIDASCREEN® Sero ELISA se suministran adicionalmente en los kits RIDASCREEN® Sero ELISA. Son controles para realizar un control de calidad adicional, siendo su uso optativo. Contienen suero control humano a distintas concentraciones de anticuerpo.

9.2. Preparación del buffer de lavado

Se mezcla 1 parte del buffer de lavado concentrado **SeroWP** con 9 partes de agua destilada. Con este fin se transfieren 100 ml del concentrado a una probeta de 1000 ml y se completa con agua destilada a 1000 ml. Los cristales que pudieran encontrarse en el buffer concentrado se deben solubilizar primeramente con calor (baño María a 37 °C). El buffer de lavado diluido se puede conservar 4 semanas si se mantiene a 2 – 8 °C, o cinco días a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.3. Preparación de las muestras

Las muestras de suero que se analizarán se diluyen 1:100 con el buffer de muestras **SeroPP** antes de comenzar el test.

por ej. 10 µl Suero + 990 µl **SeroPP**

Para las determinaciones de IgM se recomienda que antes de realizar el análisis se sometan las muestras de suero a la absorción con IgG (por ej. con RIDA[®] RF-Absorbent, prod. n°Z0202) y posteriormente ajustar con el buffer de muestras a la dilución necesaria en el test.

¡Atención!

Los controles estándar y negativo y los controles A y B están listos para el uso y no deben ser diluidos ni absorbidos.

9.4. Primera incubación

Después de introducir suficiente cantidad de cavidades en el marco de la microplaca se pipetea respectivamente 100 µl de los sueros diluidos, así como de los controles, a los pocillos correspondientes y dejando la posición A1 libre (valor blanco de los reactivos). El control negativo, **Control IgG -** o el **Control IgM -**, se determina una vez y el control estándar, **Control IgG +** o el **Control IgM +**, se determina por duplicado. Añadir el control A y el control B una vez. La microplaca se incuba.

30 minutos a 37 °C en una estufa. Cuidar que el fondo de las cavidades no tenga contacto con materiales de buena transferencia calorífica (metal o papel húmedo). Se debe cubrir la microplaca durante la incubación.

Se utilizan los controles correspondientes (IgG ó IgM) a la determinación.

A1	Valor blanco de los reactivos
B1	Control negativo
C1	Control estándar
D1	Control estándar
E1	Control A
F1	Control B
G1, H1	Suero de pacientes 1, 2, etc.

¡Atención!

La microplaca de titulación no debe colocarse en una cámara de incubación que esté fría y sea calentada posteriormente a 37 °C. La cámara debe estar adaptada previamente a 37 °C.

9.5. Lavado

Las cavidades se deben vaciar a un recipiente de desechos con hipoclorito para la desinfección. Posteriormente se sacude la placa sobre un papel absorbente para eliminar los restos de humedad. Seguidamente se lava 4 veces con 300 µl de buffer de lavado en cada caso. Después de cada enjuague se cuida de vaciar completamente la placa sacudiéndola sobre partes secas y no usadas del papel.

Cuando se usen lavadores automáticos se debe poner atención al ajuste correcto del instrumento al tipo de microplaca utilizado. Después del último lavado se debe sacudir la placa cuidadosamente sobre papel absorbente limpio o paños de laboratorio para eliminar la humedad residual.

9.6. Segunda incubación

Adición de 100 µl de conjugado **SeroG LD** ó **SeroM LD** a las cavidades correspondientes (incluida la A1). A continuación se incuba la microplaca 30 minutos a 37 °C en una estufa (véase el punto 9.4.).

9.7. Lavado

Lavar 4 veces según el punto 9.5.

9.8. Tercera incubación

Añadir 100 µl de sustrato **SeroSC** a cada una de las cavidades. A continuación se incuba la microplaca durante 30 minutos a 37 °C en una cámara húmeda / incubador. Después se adicionan 100 µl de reactivo de parada **SeroStop** en cada una de las cavidades para detener la reacción. Se mezcla cuidadosamente (con ligeros golpes en los bordes de la placa) y se mide la absorbancia a 450 nm en un fotómetro lector de placas (longitud de onda de referencia ≥ 620 nm). La compensación del valor cero se hace contra el valor blanco de los reactivos (posición A1).

Atención:

Para eliminar el agua condensada se debe pasar un paño por el fondo exterior de la microplaca antes de realizar la medición.

10. Control de calidad e Indicios de inestabilidad o deterioro

Como control de calidad se debe incluir en cada test un control estándar (en determinación doble) y un control negativo. El test ha transcurrido correctamente, si el valor promedio de la absorbancia del estándar de control a 450/620 nm se encuentra en el rango de valores que se plantea en la hoja de datos adjunta. Si los valores de las dos mediciones individuales difieren del valor promedio en más de 20 %, se requiere repetir el test. El control negativo debe tener un valor de absorbancia < 0,3 a 450/620 nm.

Los controles A y B de RIDASCREEN® Sero ELISA son controles adicionales para realizar control de calidad que pueden emplearse opcionalmente.

Los valores diana están indicados en el certificado de calidad de lote. Los valores obtenidos (U/ml, IU/ml o mUI/ml) deberían tomarse como valores de referencia para el aseguramiento de calidad en laboratorios acreditados.

Una desviación de los valores requeridos, lo mismo que una turbidez o coloración azul del sustrato antes de ser transferidos a las cavidades, puede ser un indicio del vencimiento de los reactivos.

Si los valores predefinidos no se cumplen, se deben verificar los siguientes puntos antes de repetir el análisis:

- Durabilidad de los reactivos empleados
- Funcionamiento correcto de los instrumentos utilizados (por ej. la calibración)
- Ejecución correcta del test
- Control visual de los componentes del kit con respecto a contaminación o pérdida de hermeticidad; una solución de sustrato azulada no se debe volver a usar.

Si al repetir la determinación se obtienen nuevamente valores incorrectos Ud. debe dirigirse al fabricante.

11. Evaluación e interpretación

La evaluación del test puede realizarse en tres formas diferentes:

1. mediante la curva de calibración adjunta
2. con los valores de la tabla (véase la hoja de datos adjunta)
3. matemáticamente por el método de los 4-parámetros o con el método α

Antes de la evaluación se debe restar a todos los valores de absorbancia medidos el valor blanco de los reactivos.

11.1. Evaluación mediante la curva de calibración

Para realizar la evaluación mediante la curva de calibración, es preciso primeramente efectuar una corrección de las variaciones durante el día con ayuda del valor promedio del estándar de control. A partir del valor nominal del estándar de control y del valor medido para el control se calcula el Factor de Corrección F. Este valor nominal es dependiente del lote y se incluye en la hoja de datos adjunta.

$$F = \frac{\text{Valor nominal del Estándar de control}}{\text{Valor promedio de la Absorbancia del Estándar de control}}$$

Los valores de DO medidos para cada muestra se multiplican por el Factor F. Con estos valores corregidos se efectúa entonces la lectura del valor correspondiente U/ml en la curva estándar.

11.2. Evaluación mediante la tabla de valores

	U/ml	Rango de valores del Estándar de control	
			0,85 - 0,91
-	< 16,0		< 0,26
?	16,0 - 20,0		0,26 - 0,30
+	20,1 - 50,0		0,31 - 0,54
	50,1 - 100,0		0,55 - 0,78
	100,1 - 200,0		0,79 - 1,04
	200,1 - 400,0		1,05 - 1,29
	400,1 - 1000,0		1,30 - 1,65
	> 1000,0		> 1,65

Fig. 1: Ejemplo de una determinación de IgG
(Extracto de una hoja de datos específica de un lote)

El valor promedio de la absorbancia del estándar de control define en la tabla de valores cual columna de rango de valores es la válida para la presente medición. Dentro de cada columna se asigna el valor de absorbancia medido para la muestra al rango de absorbancia adecuado y en la segunda columna, de izquierda a derecha, se hace la lectura del valor de contenido correspondiente en U/ml.

El valor de absorbancia promedio del estándar de control para una medición es por ej. 0,86. En este caso la columna adecuada de la tabla para determinar el resultado es la del rango 0,85 hasta 0,91. Una muestra de un paciente con un valor de absorbancia de 0,65 se encuentra entonces en un rango de contenido de 50,1 hasta 100,0 Unidades/ml. (Los valores

mencionados se deben considerar como ejemplo solamente y pueden variar con respecto a los valores de la hoja de datos específica.)

La evaluación de los resultados encontrados - positivo (+), negativo (-) ó valores límite (?) - se deben extraer de la primera columna de la tabla de valores.

11.3. Evaluación matemática

Los valores necesarios para la evaluación matemática por el método de los 4-parámetros o con el método α están contenidos en la hoja de datos adjunta.

11.4. Resultado del test

Tabla 3: Evaluación de las Unidades encontradas

	IgG	IgM
negativo	< 16 U/ml	< 16 U/ml
valores límite	16 -20 U/ml	16 -20 U/ml
positivo	> 20 U/ml	> 20 U/ml

12. Limitaciones del método

Los tests RIDASCREEN[®] HSV 1+2 EIA reaccionan con anticuerpos dirigidos específicamente contra los virus Herpes simplex tipos 1 y 2. No es posible a partir de este test deducir una relación entre la magnitud de un valor de absorbancia obtenido y la manifestación o gravedad de síntomas clínicos. Los resultados obtenidos siempre deben interpretarse de conjunto con el cuadro clínico.

Un resultado negativo no excluye una posible infección con el HSV. En un punto prematuro de la infección la formación de anticuerpos puede aún ser tan baja que el examen tenga un resultado negativo. Si existe la sospecha clínica de una infección, se debe repetir el test con un nuevo suero después de transcurridas dos a cuatro semanas .

En general siempre en los exámenes serológicos se deben analizar dos sueros sucesivos de pacientes para perfeccionar los resultados diagnósticos. El curso que ha seguido el contenido encontrado en los análisis es importante para la interpretación del resultado.

La diferenciación entre los tipos 1 y 2, a nivel de anticuerpos, solamente es posible lograrla con un ELISA basado en glicoproteína G como antígeno (RIDASCREEN[®] HSV 1 IgG, prod. n° K5121 o el RIDASCREEN[®] HSV 2 IgG, prod. n° K5221).

Un resultado positivo de IgM indica una infección primaria. Sin embargo en casos de recidivas severas puede ocurrir una nueva formación de anticuerpos IgM.

Un resultado positivo no excluye la presencia de otros agentes infecciosos como causa de una enfermedad.

13. Características de rendimiento

Tabla 4: Varianza inter-ensayos (n=5)

<u>Varianza inter-ensayos</u>	<u>IgG</u>		<u>IgM</u>	
	DO	Coefficiente de variabilidad	DO	Coefficiente de variabilidad
Suero 1	0,068	10,8 %	0,166	3,1 %
Suero 2	0,556	8,3 %	0,672	5,5 %
Suero 3	1,564	4,3 %	1,844	4,7 %

Tabla 5: Varianza intra-ensayos (n=24)

<u>Varianza intra-ensayos</u>	<u>IgG</u>		<u>IgM</u>	
	DO	Coefficiente de variabilidad	DO	Coefficiente de variabilidad
Suero 1	0,075	9,4 %	0,135	9,9 %
Suero 2	0,582	7,7 %	0,539	7,1 %
Suero 3	1,618	3,9 %	1,514	4,7 %

Tabla 6: Sensibilidad y especificidad en comparación con otros dos ELISA comerciales

	IgG	IgM
Sensibilidad	97,8 %	100,0 %
Especificidad	100,0 %	96,9 %

Tabla 7: Resultados del análisis de 212 sueros de donantes de sangre procedentes de un centro de donación de Alemania

212 sueros de donantes de sangre	IgG	IgM
negativo	19,8 %	88,2 %
valores límite	1,4 %	7,5 %
positivo	78,8 %	4,2 %

Bibliografía

1. Hashido, M., Kawana, T.: Herpes simplex virus-specific IgM, IgA and IgG subclass antibody responses in primary and nonprimary genital herpes patients. *Microbiol. Immunol.* 41 (5): 415-420 (1997)
2. Juto, P., Settergren, B.: Specific serum IgA, IgG and IgM antibody determination by a modified indirect ELISA-technique in primary and recurrent herpes simplex virus infection. *J. Virol. Methods* 20 (1): 45-55 (1988)
3. Kunkel, M., Oberender, H.: Herpes simplex virus type 2 infection. Etiology, clinical aspects, diagnosis, therapy, HSV-2 and cervix cancer. *Zentralbl. Gynakol.* 107 (24): 1473-1478 (1985)
4. Morris, G.E., Coleman, R.M., Best, J.M., Benetato, B.B., Nahmias, A.J.: Persistence of serum IgA antibodies to herpes simplex, varicella-zoster, cytomegalovirus, and rubella virus detected by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Med. Virol.* 16 (4): 343-349 (1985)
5. Rabie-Finger, H., Valentine-Thon, E., Steinmann, J., Nehrkorn, A.: Serological responses to herpes simplex virus type 1 (HSV-1) analysed with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot (WB). *Acta Virol.* 35 (2): 113-126 (1991)
6. Webb, D.H., Fife, K.H.: Genital herpes simplex virus infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 1 (1): 97-122 (1987)