

RIDASCREEN[®] HSV 1 IgG, IgM

Art. N°: K5121 (IgG)
K5131 (IgM)



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



1. Área de aplicação

Para diagnóstico *in vitro*. Os testes RIDASCREEN® HSV 1 são testes imunoenzimáticos para determinação quantitativa de anticorpos IgG ou IgM contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV 1) no soro humano.

Os testes devem ser realizados no caso de suspeita fundada de uma infecção com HSV 1 ou para esclarecimento do estado imunológico.

2. Resumo e explicação do teste

Após a infecção com HSV, formam-se anticorpos específicos contra o agente patogênico devido à reação do sistema imunológico. Estes anticorpos podem ser determinados no soro por meio de métodos imunológicos. O método de teste utilizado e a escolha do antígeno específico para o agente patogênico são importantes para a força probatória do teste.

3. Princípio do teste

Antígenos purificados estão ligados à microplaca. Os anticorpos existentes no paciente fixam-se aos antígenos e são determinados em um segundo passo da incubação mediante utilização de anticorpos anti-humanos marcados com enzimas (conjugado). As enzimas convertem o substrato incolor (H_2O_2/TMB) em um produto final azul. A reação enzimática é terminada mediante a adição de ácido sulfúrico e a cor desta mistura muda de azul para amarelo. A medição final é feita em um fotômetro a 450 nm com um comprimento de onda de referência ≥ 620 nm.

4. Conteúdo da embalagem

Tab. 1: Conteúdo da embalagem (Os reagentes de uma embalagem são suficientes para 96 testes)

			K 5121 IgG	K 5131 IgM
Placa	96 testes	Microplaca; 12 tiras (divisíveis) no suporte; revestidas com glicoproteína recombinante G1 (gG1) de HSV 1	X	
Placa	96 testes	Microplaca; 12 tiras (divisíveis) no suporte; revestidas com antígenos totais de HSV 1		X
SeroPP	110 ml	Tampão de amostra, pronto para uso; solução NaCl tamponada com fosfato, coloração amarela;	X	X
SeroWP	100 ml	Tampão de lavagem, 10x concentrado; solução NaCl tamponada com Tris;	X	X
Control IgG + tampa verde	2,5 ml	Controle padrão IgG, pronto para uso; soro humano diluído, coloração verde;	X	
Control IgM + tampa vermelha	2,5 ml	Controle padrão IgM, pronto para uso; soro humano diluído, coloração vermelha;		X
Control IgG - tampa incolor	1,2 ml	Controle negativo IgG, pronto para uso; soro humano diluído;	X	
Control IgM - tampa incolor	1,2 ml	Controle negativo IgM, pronto para uso; soro humano diluído;		X
Control IgG A tampa verde	1,2 ml	Controlo de qualidade A IgG, pronto para uso; soro humano diluído;	X	
Control IgG B tampa verde	1,2 ml	Controlo de qualidade B IgG, pronto para uso; soro humano diluído;	X	
Control IgM A tampa vermelha	1,2 ml	Controlo de qualidade A IgM, pronto para uso; soro humano diluído;		X
Control IgM B tampa vermelha	1,2 ml	Controlo de qualidade B IgM, pronto para uso; soro humano diluído;		X
SeroG LD tampa verde	12 ml	Conjugado anti-humano IgG LD (cabra), pronto para uso; anticorpos conjugados com peroxidase em solução proteica estabilizada;	X	
SeroM LD tampa vermelha	12 ml	Conjugado anti-humano IgM LD (cabra), pronto para uso; anticorpos conjugados com peroxidase em solução proteica estabilizada;		X
SeroSC	12 ml	Substrato H ₂ O ₂ /tetrametilbenzidina; pronto para uso	X	X
Stop	12 ml	Reagente de parada 1 N ácido sulfúrico; pronto para uso	X	X

Detalhes sobre substâncias perigosas de acordo com as obrigações de rotulagem. Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com

5. Reagentes e seu armazenamento

O kit de teste deve ser armazenado entre 2 – 8 °C e pode ser utilizado até à expiração da data de validade impressa na etiqueta. Quando armazenado a uma temperatura entre 2 – 8 °C, o tampão de lavagem diluído pode ser utilizado quatro semanas; quando armazenado a temperatura ambiente (20 – 25 °C) pode ser utilizado uma semana. Após expiração da data de validade a qualidade não é garantida.

A embalagem de alumínio que contém a microplaca deve ser aberta de forma a não se arrancar o fecho. As tiras de microtitulação que não são necessárias devem ser guardadas imediatamente na embalagem de alumínio fechada entre 2 – 8 °C.

A contaminação dos reagentes deve ser impedida e o substrato incolor não deve ser exposto à incidência de luz direta.

6. Reagentes adicionais necessários e equipamento acessório

6.1. Reagentes

- água destilada ou desionizada

6.2. Equipamento acessório

- Incubadora a 37 °C
- Tubos de teste
- Misturador Vortex
- Micropipetas para volumes de 10 – 100 µl e 100 – 1000 µl
- Proveta (1000 ml)
- Cronômetro
- Lavadora para microplacas ou pipetas multicanais
- Fotômetro para microplacas (450 nm, filtro de referência ≥ 620 nm)
- Papel filtro (panos de laboratório)
- Recipiente para lixo com uma solução de 0,5 % de hipoclorito de sódio

7. Medidas de precaução

Somente para diagnóstico *in vitro*.

Este ensaio só deve ser realizado por profissionais de laboratório treinados. As diretrizes para trabalhar em laboratórios médicos devem ser seguidas. O manual de instruções relativo ao procedimento de ensaio deve ser seguido. Não pipete amostras ou reagentes com a boca. Evite o contato com a pele ferida ou membranas mucosas. Ao manusear reagentes ou amostras, use roupas de segurança adequadas (luvas apropriadas, jaleco, óculos de segurança) e lave suas mãos após o término do procedimento de ensaio. Não fume, coma ou beba nas áreas onde estão sendo usados amostras ou reagentes.

Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com

Os soros de controle contidos no kit (controle padrão, controle negativo, controlo de qualidade A e controlo de qualidade B) foram testados para HIV e HCV-Ak, bem como HbsAg, e considerados negativos. Porém, eles devem, bem como as amostras de pacientes e todos os materiais que entrem em contato com eles, ser considerados como potencialmente infecciosos e manejados de acordo com as respectivas regras de segurança nacionais.

Todos os reagentes e materiais utilizados devem ser descartados corretamente após o uso. Consulte os regulamentos nacionais relevantes para a eliminação.

8. Coleta e armazenamento das amostras

O teste foi desenvolvido para a análise de amostras de soro humano. Depois da coleta, o soro devia ser separado do coágulo sanguíneo o mais rapidamente possível para evitar hemólise. As amostras devem ser armazenadas em lugar frio ou congeladas até serem analisadas. Deve-se evitar necessariamente o congelamento e descongelamento repetidos das amostras bem como a contaminação com micróbios. A utilização de amostras lipêmicas, hemolíticas, ictéricas, turvas ou inativadas por calor podem produzir resultados falsos.

Tab. 2: Armazenamento das amostras

Soro não-diluído		Soro diluído
2 – 8 °C	–20 °C	2 – 8 °C
1 semana	> 1 semana	7 horas

9. Realização do teste

9.1. Generalidades

Antes de serem utilizados, todos os reagentes e as tiras de microtitulação têm de estar a temperatura ambiente (20 – 25 °C). As tiras de microtitulação não devem ser retiradas da embalagem de alumínio antes de atingirem a temperatura ambiente. Os reagentes devem ser bem misturados pouco antes de serem utilizados. Após a utilização, o kit deve ser armazenado de novo imediatamente entre 2 – 8 °C.

Só deve ser retirado o volume de reagente necessário para a realização do teste. Excessos de reagente não devem ser vertidos novamente nos frascos devido ao risco de contaminação.

As tiras de microtitulação não devem ser utilizadas mais do que uma vez. Os reagentes e as tiras de microtitulação não devem ser utilizados quando a embalagem estiver danificada ou os frascos apresentarem derrames.

Alguns dos reagentes incluídos no kit não são específicos para o teste. Estes reagentes marcados com Sero (por ex. **SeroPP**) também podem ser utilizados em outros testes RIDASCREEN® Sero ELISA com os reagentes correspondentes.

Os soros de controle são específicos do lote. Não é permitido trocar os soros de controle dos kits com um número de lote diferente.

Os controlos de qualidade A e B RIDASCREEN® Sero ELISA são fornecidos adicionalmente como componentes específicos para o respectivo kit de teste RIDASCREEN® Sero ELISA. Trata-se de controlos que podem ser aplicados opcionalmente para segurança adicional da qualidade. Eles contêm soro de controle humano com diferentes concentrações de anticorpos.

9.2. Preparação do tampão de lavagem

1 parte do tampão de lavagem **SeroWP** é misturada com 9 partes de água destilada. Para isso, verte-se 100 ml de concentrado em uma proveta de 1000 ml e adiciona-se água destilada até se atingir os 1000 ml. Os cristais eventualmente existentes no concentrado devem ser dissolvidos previamente mediante aquecimento em banho-maria a 37 °C. O tampão de lavagem diluído pode ser utilizado o máximo de quatro semanas quando armazenado entre 2 – 8 °C e uma semana quando armazenado a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.3. Preparação das amostras

As amostras de soro a analisar são diluídas com o tampão **SeroPP** 1:100 antes de se iniciar o teste.

por ex. 10 µl de soro + 990 µl de **SeroPP**

Para a determinação de IgM, recomendamos submeter os soros a uma absorção de IgG (por ex. com RIDA® RF-Absorbens, art. nº. Z0202) antes do teste.

Atenção!

O controle negativo e controle padrão, controlo de qualidade A e controlo de qualidade B estão prontos para uso e não devem ser diluídos ou absorvidos.

9.4. Primeira incubação

Depois de se encaixar uma quantidade de tiras/poços suficientes no suporte, pipetar 100 µl de soros diluídos e 100 µl de controles prontos para uso nos respectivos poços e deixar a posição A1 (valor em branco do reagente) vazia. Adicionar o controle negativo **Control IgG | -** ou **Control IgM | -** uma vez e o controle padrão **Control IgG | +** ou **Control IgM | +** duplicado. Adicionar o controlo de qualidade **Control IgG | A** e **Control IgG | B** ou **Control IgM | A** e **Control IgM | B** uma vez. Cobrir a placa e incubá-la 30 minutos a 37 °C em uma incubadora. Durante este processo, o exterior do fundo dos poços não deve estar em contato com materiais de boa condutibilidade térmica. A microplaca deve estar coberta durante o processo de incubação.

Devem ser utilizados os controles que correspondem à determinação (IgG ou IgM).

A1	Valor em branco do reagente
B1	Controle negativo
C1	Controle padrão
D1	Controle padrão
E1	Controlo de qualidade A
F1	Controlo de qualidade B
G1,H1	Soro do paciente 1, 2 etc.

Atenção!

A microplaca não deve ser colocada em um contêiner de incubação frio que só aquece a 37 °C durante a incubação. O contêiner tem de estar previamente adaptado a 37 °C.

9.5. Lavagem

Os poços devem ser esvaziados em um recipiente de lixo com solução de hipoclorito para desinfecção. Em seguida bate-se na placa sobre papel absorvente para remover o resto da umidade. Depois disso, lava-se a placa 4 vezes com 300 µl de tampão de lavagem de cada vez. Assegurar que ela é esvaziada completamente batendo-lhe depois de cada uma das quatro lavagens sobre uma parte do papel ainda não usada.

Utilizando-se uma lavadora de microplacas deve-se verificar se ela está corretamente programada para o tipo de placa em questão. Depois da lavagem, deve-se bater na placa sobre papel absorvente limpo para remoção do resto da umidade.

9.6. Segunda incubação

Adicionar 100 µl de conjugado anti-humano IgG LD **SeroG LD** ou conjugado anti-humano IgM LD **SeroM LD** nos poços correspondentes (inclusivamente A1). Em seguida incubar a placa 30 minutos a 37 °C em uma incubadora (ver ponto 9.4.).

9.7. Lavagem

Lavar 4 vezes como descrito no ponto 9.5.

9.8. Terceira incubação

Adicionar 100 µl de substrato **SeroSC** em todos os poços. Em seguida incubar a placa 30 minutos a 37 °C em uma incubadora. Depois disto, adicionar 100 µl de solução de parada **Stop** em todos os poços para terminar a reação. Depois de misturá-la cuidadosamente (batendo-se suavemente na beira da placa), medir a extinção a 450 nm (comprimento de onda de referência ≥ 620 nm). Calibrar a zero o valor em branco do reagente (posição A1).

Atenção:

Antes de realizar a medição, limpar a água condensada da parte inferior da microplaca.

10. Controle de qualidade e sinais de caducidade do reagente

Para fins de controle de qualidade, devem ser sempre utilizados o controle padrão (duplamente) e o controle negativo cada vez que se efetuar um teste. O teste foi realizado corretamente quando a extinção média do controle padrão a 450/620 nm estiver na gama indicada na folha de dados anexa. Se ambas as medições individuais apresentarem desvios à média superiores a 20%, o teste tem de ser repetido. O controle negativo a 450/620 nm tem de apresentar um valor de extinção $< 0,3$.

Os controles de qualidade A e B RIDASCREEN® Sero ELISA são controles adicionais que podem ser utilizados opcionalmente para fins de controle da qualidade. As gamas-alvo devem ser consultadas no certificado de garantia de qualidade anexo, específico do lote. Os valores (U/ml, IU/ml ou mIU/ml) obtidos são recomendados aos usuários como valores de referência para a garantia de qualidade do laboratório.

Se os valores divergirem dos requeridos ou se os reagentes estiverem turvos ou o substrato estiver azulado antes de serem adicionados nos poços, pode ser sinal de que os reagentes já caducaram.

Se os valores estipulados não forem atingidos, há que verificar os pontos seguintes antes da repetição do teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento utilizado (calibração, por exemplo)
- Realização correta do teste
- Controle visual dos componentes do kit quanto a contaminação ou má vedação; uma solução de substrato com coloração azulada já não deve ser utilizada

Se após a repetição do teste as condições continuarem insatisfatórias, contate o fabricante.

11. Avaliação e interpretação

O teste pode ser avaliado mediante três métodos diferentes:

1. Mediante a curva padrão fornecida no kit
2. Mediante a tabela de valores (ver folha de dados anexa)
3. Matematicamente mediante o método de 4 parâmetros ou o método α

O valor em branco do reagente tem de ser subtraído de cada valor de extinção antes da avaliação.

11.1. Avaliação mediante a curva padrão

Para se poder realizar a avaliação mediante a curva padrão há que efetuar primeiro, através da média do controle padrão, uma correção das flutuações que podem ocorrer de um dia para o outro. Do valor teórico do controle padrão e do valor do controle atualmente medido, calcula-se o fator de correção F. O valor teórico dependente do lote está mencionado na folha de dados anexa.

$$F = \frac{\text{Valor teórico do controle padrão}}{\text{Valor médio de absorbância do controle padrão}}$$

Todos os valores OD das amostras são multiplicados pelo fator F. Com estes valores corrigidos, lê-se depois o valor U/ml correspondente na curva padrão.

11.2. Avaliação mediante a tabela de valores

	U/ml	Gama de valores do controle padrão	
			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: Exemplo de uma determinação de IgG
(Extrato de uma folha de dados específica de um lote)

O valor de extinção médio do controle padrão é decisivo para identificar na tabela de valores qual é a coluna com a gama de valores válida para a medição atual. Nesta coluna, atribui-se o valor de extinção da amostra medido à gama de extinção correspondente e na segunda coluna da esquerda para a direita lê-se a respectiva titulação em U/ml.

Por exemplo, o valor de extinção médio de um controle padrão de uma medição é 0,86. Neste caso, a coluna da tabela com a gama 0,85 a 0,91 é a coluna a utilizar para o apuramento do resultado. Uma amostra de paciente com um valor de extinção 0,65 corresponde a uma gama de titulação entre 50,1 a 100,0 Units/ml. (Os valores citados são exemplificativos e podem divergir dos valores atuais da folha de dados.)

A avaliação do resultado apurado - positivo (+), negativo (-) ou duvidoso (?) - consulta-se na primeira coluna da tabela de valores.

11.3. Avaliação matemática

Os valores necessários para a avaliação matemática pelo método de 4 parâmetros ou pelo método α estão mencionados na folha de dados anexa.

11.4. Resultado do teste

Tab. 3: Avaliação das "units" apuradas

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

12. Limites do método

Os testes RIDASCREEN® HSV 1 ELISA detectam anticorpos IgG ou IgM contra HSV 1. Dos testes não se pode concluir uma relação entre o valor de extinção medido e a manifestação ou a gravidade de sintomas clínicos. Os resultados obtidos devem ser sempre interpretados em associação com o quadro clínico.

O teste IgG contém a glicoproteína G1 (gG1) como antígeno. Esta gG1 é altamente específica para a detecção de anticorpos IgG contra HSV 1. As reações cruzadas com anticorpos contra HSV 2 conhecidas quando da utilização de antígenos totais não ocorrem neste teste. Só assim é possível comprovar serologicamente a existência de uma infecção HSV 1 de modo inequívoco.

Os anticorpos IgM estão, na maior parte, orientados contra outros antígenos que a glicoproteína G1. Por isso, o teste IgM contém antígeno total de HSV 1. Este apresenta, em parte, epítomos similares ao antígeno HSV 2 pelo que os anticorpos IgM contra HSV 2 podem levar a um sinal positivo no teste. O teste, no entanto, está calibrado de tal forma que um resultado IgM muito mais alto no teste HSV 1 em comparação com o teste RIDASCREEN® HSV 2 ELISA pode ser interpretado como indicação de uma infecção HSV 1. Para melhor fiabilidade do diagnóstico, recomendamos realizar paralelamente a análise de anticorpos contra HSV 1 e HSV 2.

Um resultado positivo IgM nem sempre comprova uma infecção primária. No caso de recorrências, podem formar-se novamente anticorpos IgM em casos isolados.

Um resultado negativo não exclui necessariamente uma infecção com HSV. No estado inicial da infecção, a formação de anticorpos pode ser tão pequena que o resultado da análise é negativo. No caso de suspeita clínica, deve ser coletada uma nova amostra de soro passado duas a quatro semanas para nova análise.

Quando de análises serológicas, deviam ser analisadas normalmente sempre duas amostras de soro do paciente consecutivas para aumentar a força de afirmação do diagnóstico. O progresso da titulação é importante para a interpretação do resultado.

Um resultado positivo não exclui a presença de outros agentes patogênicos infecciosos como causa de uma doença.

13. Características de desempenho

Tab. 4: Variação inter-teste (n=30)

<u>Variação inter-teste</u>	<u>IgG</u>		<u>IgM</u>	
	OD	VK	OD	VK
Soro 1	1,152	11,0 %	1,050	1,9 %
Soro 2	0,596	13,6 %	0,434	3,3 %
Soro 3	0,036	n/a	0,151	n/a

Tab. 5: Variação inter-teste (*n=23; n=24)

<u>Variação inter-teste</u>	<u>IgG*</u>		<u>IgM</u>	
	OD	VK	OD	VK
Soro 1	1,158	5,7 %	1,009	2,0 %
Soro 2	0,559	5,7 %	0,432	3,1 %
Soro 3	0,015	n/a	0,150	n/a

Tab. 6: Sensitividade e especificidade em comparação com outros dois testes ELISA comerciais

	IgG	IgM
Sensitividade	97,7 %	96,8 %
Especificidade	100,0 %	97,2 %

Tab. 7: Resultados da análise do soro de 200 doadores de sangue de um banco de sangue na Alemanha

200 soros de doadores de sangue	IgG	IgM
negativo	53,5%	93,5%
duvidoso	0,5%	1,5%
positivo	46,0%	5,0%

Literatura

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)