

Inmunoensayo Enzimático para la Determinación de Anticuerpos IgG del Virus del Herpes simplex (HSV) Tipo 1 en Suero Humano

Solo para diagnóstico In Vitro
Para uso exclusivo en laboratorios clínicos o de gabinete
Conservar entre 2°C a 8°C

RESUMEN Y PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Paso	Temp. ambiente 20 - 25°C	Volumen	Tiempo de incubación
1	Dilución de la muestra 1:40 (5µL / 200µL)		
2	Muestras diluidas, controles y calibrador	100 µL	30 minutos
3	Buffer de lavado (3 veces)	350 µL	
4	Enzima conjugada	100 µL	30 minutos
5	Buffer de lavado (3 veces)	350 µL	
6	TMB Substrato Cromogénico	100 µL	15 minutos
7	Solución de paro	100 µL	
8	Lectura a una densidad óptica de 450 nm		

RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA

El virus del herpes simple (HSV) es un patógeno común y su infección primaria suele ser asintomática. Hay dos tipos inmunológicamente distintos de HSV: Tipo 1 y Tipo 2. HSV 1 esta asociado generalmente con la infección oral y lesiones por encima de la cintura, y HSV 2 está asociado con infecciones genitales y lesiones por debajo de la cintura. Los casos clínicos principalmente son: 1) eccema herpético con el cambio de piel eczematosa con numerosas lesiones, 2) gingivo-estomatitis y 3) Herpes sepsis, casi sólo se encuentran en los recién nacidos de los bebés prematuros. ELISA HSV 1 IgG es un método serológico preciso para detectar anticuerpos IgG específicos contra HSV en suero.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El antígeno HSV purificado está cubierto sobre la superficie de los micro-pozos. El suero diluido del paciente es agregado a los depósitos, y el anticuerpo específico de HSV 1 IgG, si se encontrara presente, se adhiere al antígeno. Todos los materiales no adheridos son lavados para su retiro. Después de agregar el conjugado de enzima, ésta se adhiere al complejo del antígeno-anticuerpo. El exceso de conjugado de enzima es lavado para su retiro y el substrato cromogénico TMB es agregado. La reacción catalítica del conjugado de enzima es detenida a un tiempo específico. La intensidad del color generado es proporcional a la cantidad de anticuerpo específico de IgG en la muestra. Los resultados son interpretados por un lector de micro-ELISA comparados de una manera paralela con un calibrador y controles.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba:

1. Placa de micropozos cubiertos de antígeno HSV 1 purificados (12x8)

2. Diluyente de Muestras. 1 Frasco
3. Calibrador. Valor del factor (f) indicado en la etiqueta. 1 Vial
4. Control Negativo: rango indicado en la etiqueta. 1 Vial
5. Control Positivo: rango indicado en la etiqueta. 1 Vial
6. Concentrado de lavado 20x. 1 Frasco
7. Enzima Conjugada. 1 Frasco
8. TMB substrato cromogénico. 1 Frasco
9. Solución de paro. 1 Frasco

ALMACENAJE Y ESTABILIDAD

1. Almacenaje del equipo de 2 a 8 °C.
2. Siempre mantenga los micro pozos herméticamente sellados en la bolsa con el desecante. Recomendamos que use hasta agotar todos los pozos dentro de las 4 semanas después de la apertura inicial de la bolsa.
3. Los reactivos son estables hasta la fecha de expiración del equipo.
4. No exponer los reactivos al calor, sol o luz fuerte durante el almacenamiento o uso.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

1. Materiales potencialmente bio-peligrosos: Los calibradores y controles contienen componentes de origen humano que han sido probados y se han encontrado no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B así como el anticuerpo de HIV con los reactivos autorizados por la FDA. Sin embargo, como con cualquier método de prueba no se puede ofrecer una completa seguridad de que los virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén ausentes, estos reactivos deben manejar el Nivel 2 de Bio seguridad, como es recomendado en los Centers for Disease Control / National Institutes of Health manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories". 1984
2. No pipetear con la boca, no fumar, comer o beber en las áreas en que las muestras o equipos son manejados.
3. Se entiende que los componentes en este equipo son para el uso de una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no deben mezclarse.
4. Estos productos contienen componentes preservados con azida de sodio. La azida de sodio puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías para formar una azida metálica explosiva. En disposición, vacíe con un gran volumen de agua.

RECOLECCIÓN Y MANEJO DEL ESPÉCIMEN

1. Recolecte muestras sanguíneas y separe el suero.
2. Los especímenes pueden ser refrigerados a 2-8 °C por hasta siete días o congelados por hasta seis meses. Evite el congelado y descongelado repetitivo de la muestra de suero.

PREPARACIÓN PARA EL ENSAYO

1. Prepare búfer de lavado 1x. Prepare el amortiguador de lavado al agregar agua destilada o desionizada al concentrado de lavado 20x para obtener un volumen final de 1 litro.
2. Ponga todos los especímenes y reactivos del equipo de prueba a temperatura ambiente (20 - 25°C) y mezcle suavemente.

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Colocar el número deseado de tiras recubiertas en el soporte.
2. Preparar la dilución 1:40 de las muestras de prueba, control negativo, control positivo y calibrador al agregar 5 µL de la muestra a 200 µL del diluyente de muestra. Mezcle bien.
3. Dispensar 100 µL de suero diluido, calibrador, y controles en los depósitos apropiados. Para el blanco de reactivo, vierta 100 µL de diluyente de muestra en la posición del pozo A1. Mezcle e incube por 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar el líquido de todos los depósitos y repita el lavado tres veces con el búfer de lavado.
5. Dispensar 100 µL de enzima conjugada a cada pozo e incube por 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Retirar el conjugado de enzima de todos los pozos. Repita el lavado 3 veces con el búfer de lavado.
7. Dispensar 100 µL de TMB substrato cromogénico a cada pozo e incube por 15 minutos a temperatura ambiente.
8. Dispensar 100 µL de solución de paro para detener la reacción. *Nota: Asegúrese que no existan burbujas de aire en cada pozo antes de la lectura.*
9. Leer a 450 nm D.O. con un lector de micro-pozos.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Para obtener el valor del Cut-off, multiplique la D.O. del calibrador por el factor (f) impreso en la etiqueta del calibrador.
2. Calcule el índice IgG para cada determinación dividiendo los valores de las densidades ópticas de cada muestra obtenida entre el valor obtenido del Cut-off.

Ejemplo:

Valor del factor impreso en la etiqueta (f) = 0.4

Calibrador D.O. = 1.100

Cut off D.O. = 1.100 x 0.4 = 0.44 (Index IgG = 1)

Muestra del paciente D.O. = 0.580

IgG Index = 0.580 / 0.44 = 1.32 (Resultado Positivo)

Muestra del paciente D.O. = 0.320

IgG Index = 0.320 / 0.44 = 0.73 (Resultado Negativo)

CONTROL DE CALIDAD

La corrida de la prueba podría ser considerada válida siempre y cuando los siguientes criterios sean cumplidos:

- El valor D.O. del blanco de reactivo comparado con aire de un lector de micro ELISA y ser menor de 0.150.
- Si el valor D.O. del Calibrador es menor de 0.250, la prueba no es válida y debe ser repetida.
- El índice HSV 1 IgG para el Control Positivo y Negativo debe encontrarse en el rango descrito en las etiquetas.

INTERPRETACIÓN

- **NEGATIVO:** El índice HSV 1 IgG menor de 0.90 es seronegativo para el anticuerpo IgG de HSV 1.
- **INDETERMINADO:** Índice HSV 1 IgG entre 0.91-0.99 es equívoco. La prueba debe ser repetida.
- **POSITIVO:** Índice de HSV 1 IgG de 1.00 o mayor es seropositivo para HSV1.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD

Un total de 66 muestras de pacientes fueron utilizadas para evaluar la especificidad y sensibilidad de la prueba. La prueba de ELISA HSV 1 IgG fue comparada con un ELISA comercial arrojando los siguientes resultados:

		ELISA de Referencia			
		N	E	P	Total
International Immunodiagnostic	N	20 (D)	0	0 (B)	20
	E	0	0	1	1
	P	0 (C)	0	45 (A)	45
	Total	20	0	46	66

Sensibilidad = $A / (A+B) = 45 / (45+0) = 100\%$

Especificidad = $D / (C+D) = 20 / (0+20) = 100\%$

Exactitud = $(A+D) / (A+B+C+D) = 45+20 / (45+0+0+20) = 65/65 = 100\%$

PRECISIÓN

La precisión del ensayo (análisis) fue evaluada por medio de la prueba de tres diferentes sueros de ocho réplicas durante una semana. El C.V. de intra-ensayo y el inter-ensayo están resumidos enseguida:

	Negativo	Positivo Bajo	Positivo
Intra-ensayo	8.9%	7.5%	6.8%
Inter-ensayo	10.3%	8.3%	7.5%

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Así como con otros ensayos serológicos, los resultados de estos ensayos deben ser utilizados junto con la información disponible de evaluación clínica y otros procedimientos diagnósticos.
2. Las muestras obtenidas muy prematuramente durante la infección primaria podrían no contener anticuerpos detectables.
3. Una sola muestra de suero no debe ser utilizada para ayudar en el diagnóstico de una infección reciente. Las muestras en pares deben ser recolectadas y probadas simultáneamente para detectar seroconversión.

REFERENCIAS

1. Nahmias, A.J., J. Dannenbarger, C. Wickliffe and M. Muther. *Clinical aspects of infection with herpes simplex viruses 1 and 2 in the human herpes viruses. An interdisciplinary Perspective* (Nahmias, A.J. W.R. Dawle and R.F. Schinazi eds) New York, Elsevier, pp 3-9, 1981.
2. Vestergaard, B.F., P.C. Grauballe and H. Spanggaard. *Titration of herpes simplex virus antibodies in human sera by the enzyme-link immunosorbent assay (ELISA)*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect B* 85:446-448, 1977.
3. Coleman, R.M. L. Pereira P.D. Bailey, D. Dondero, C. Wickliffe, and A.J. Nahmias. *Determination of herpes simplex virus type-specific antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay*. *J. Clin. Microbiol.* 18 (1983)287.

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:

INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS
1155 CHESS DRIVE No. 121
FOSTER CITY, CA 94404 USA