

### INDICACIONES DE USO

Inmunoensayo para la determinación del anticuerpo HSV-2 IgM en suero humano.

Agente de diagnóstico de uso in vitro.

Para uso exclusivo en laboratorio clínico o de gabinete.

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los virus HSV-1 y HSV-2 (Herpes Simple) son virtualmente idénticos, compartiendo aproximadamente un 50% de su ADN y tienen más de un 80% de antígenos comunes. Ambos tipos de virus infectan las superficies mucosas del cuerpo, habitualmente boca y genitales, para posteriormente permanecer latentes en el sistema nervioso. Para ambos tipos, aproximadamente dos tercios de los infectados no muestran síntomas, o estos son demasiado débiles para ser notados. Sin embargo, ambos tipos pueden propagarse aun cuando no existan síntomas. Al llegar a la adolescencia, un 50% de los norteamericanos cuentan con anticuerpos al HSV-1. En comparación, la mayoría de los contagios de HSV-2, se produce luego de la niñez, con el inicio de la actividad sexual. El HSV-1 es causa de la mayoría de los herpes faciales y de la Encefalitis Herpética. El HSV-2 es la principal causa del herpes genital y del HSV neonatal. La reactivación del HSV latente generalmente es consecuencia de la inmunosupresión causada por cáncer, trasplantes y HIV. La presencia de anticuerpos IgM a HSV indica contagio reciente. El incremento significativo de anticuerpo IgM al HSV indica reactivación o bien, infección en curso. El anticuerpo IgM se hace presente luego del contagio.

### DESCRIPCIÓN

Ensayo inmunoabsorbente de asociación enzimática (ELISA), en donde el antígeno HSV purificado está cubierto sobre la superficie e los micropozos. El suero diluido del paciente es agregado a los depósitos y el anticuerpo específico de HSV 2 IgM se adhiere al antígeno en caso de encontrarse presente. Todos los materiales no adheridos son lavados, después se agrega el conjugado de enzima para formar un complejo del antígeno anticuerpo. La intensidad del color generado es proporcional a la cantidad de anticuerpo específico de IgM tipo 2 en la muestra. Los resultados son interpretados por un lector de Micro Elisa.

MATERIALES PROVISTOS	96 pruebas
1. 96 pocillos recubiertos con HSV-2 IgM	12x8x1
2. Diluyente 1 botella (listo para usar)	22 ml
3. Calibrador: 1 vial (listo para usar)	1 ml.
4. Control Positivo: 1 vial (listo para usar)	1 ml.
5. Control Negativo: 1 vial (listo para usar)	1 ml.
6. Enzima conjugada 1 botella (listo para usar)	12 ml.
7. Sustrato cromogenico TMB: 1 botella (listo para usar)	12 ml.
8. Solución de Frenado: 1 botella (listo para usar)	12 ml.
9. Concentrado de Lavado 20X: 1 botella (listo para usar)	25 ml.
10. Inserto	1

### MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector de micro ELISA con lente a 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrículado.

### ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a una temperatura de entre 2°C a 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre que las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Materiales con potencial riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo, no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este puede dar datos no válidos.

### RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a una temperatura de entre 2°C a 8°C por siete días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20°C hasta seis meses. Evite múltiples ciclos de congelación - descongelación.

### PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Prepare la solución de lavado 1X agregando el contenido de la botella (25X) a 475 mL de agua destilada o desionizada. Almacene a temperatura ambiente (18-26°C).

### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-26°C). Mezcle gentilmente todos los reactivos previos a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8°C.
2. Los controles (positivo y negativo) y el calibrador están listos para su uso. Prepare una dilución de las muestras de 1:21, agregando 10 µl de la muestra a 200 µl del diluyente. Mezclar bien.
3. Dispense 100 µl del suero diluido, calibrador y controles en los pozos designados. Para el reactivo blanco, dispense 100µl de diluyente de la muestra en la posición 1A. Golpee el pozo para remover las burbujas de aire del líquido y mezcle bien. Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Retire el líquido de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
5. Dispense 100 µl de conjugado enzimático en cada pozo e incube por 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Retire el conjugado enzimático de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
7. Dispense 100 µl de sustrato TMB e incube por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Agregue 100 µl de solución de frenado.

9. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

### CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Chequear el Factor de Calibración (CF) valorado en el frasco del Calibrador. Este valor puede variar de lote a lote.
2. Calcule el valor del punto de corte. Calibrador (OD) por Factor de Calibración.
3. Calcule el anticuerpo (Ab) para cada determinación, dividiendo el valor (OD) de cada muestra entre el valor del punto de corte.

### EJEMPLO DE MUESTRA TÍPICA

Media del Calibrador O.D.	0.8
Factor de Calibración (CF)	0.5
Valor Punto de Corte	0.4
Control Positivo O.D.	1.2
Anticuerpo Índice	3.0
Muestra del Paciente O.D.	1.6
Anticuerpo Índice	4.0

### CONTROL DE CALIDAD

Esta prueba puede considerarse válida siempre que se siga el siguiente criterio metodológico:

1. El OD. Del calibrador debe ser mayor que 0.250.
2. El Anticuerpo Índice para control negativo debe ser menor que 0.9.
3. El Anticuerpo Índice para control positivo debe ser menor que 1.2.

### INTERPRETACIÓN

Lo siguiente es una guía para la interpretación de resultados de HSV-2 IgM; cada laboratorio deberá establecer su criterio para interpretación basado en sus muestras.

### INTERPRETACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ÍNDICES

<0.9 Anticuerpo no detectado de HSV-2 IgM por ELISA

0.9-1.1 Sobre el límite positivo se recomienda otra identificación clínica.

>1.1 Anticuerpo detectado de HSV-2 IgM por ELISA

### LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos mediante la utilización de este kit sirven solo como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, síntomas y otros procedimientos de diagnóstico.
2. Las muestras hemolizadas o lipémicas pueden causar resultados erróneos.

### PERFORMANCE

#### 1. Sensibilidad y Especificidad:

327 pacientes fueron analizados utilizando el presente kit ELISA y un kit ELISA de referencia. 194 sueros resultaron positivos y 121 resultaron negativos por ambos métodos. Las coincidencias entre ambos fueron del 99%. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

	HSV-2 IgM ELISA		
	+	-	Total
Kit de Referencia ELISA	194	5	199
-	7	121	128
Total	201	126	327

## 2. Precisión:

### Estudio Intra-Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación %
1	16	1.06	0.04	3.7
2	16	0.75	0.03	4.0
3	16	0.57	0.04	7.0

### Estudio Inter-Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación %
1	10	1.08	0.09	8.3
2	10	0.63	0.06	9.5
3	10	0.24	0.03	12.5

### REFERENCIAS

1. Langeland N; Haarr L; Mhalu F. Prevalence of HSV-2 antibodies among STD clinic patients in Tanzania. Int J STD AIDS 1998; 9(2):104-7.
2. Markoulatos P; Labropoulou V; Kordossi A; Krikelis V; Spyrou N; Moncany ML. A combined indirect ELISA and immunoblotting for the detection of intrathecal herpes simplex virus IgM antibody synthesis in patients with herpes simplex virus encephalitis. J Clin Lab Anal 1995; 9(5):325-33.
3. Markoulatos P; Fountoucidou P; Marinakis G; Krikelis V; Spyrou N; Vamvakopoulos N; Moncany ML. Clear detection and typing of herpes simplex virus types 1 and 2 by an indirect ELISA assay: comparison with three different combined methods--capture ELISA, restriction enzymes, and polymerase chain reaction. J Clin Lab Anal 1997; 11(3):146-53.
4. Herbert AM; Bagg J; Walker DM; Davies KJ; Westmoreland D. Seroepidemiology of herpes virus infections among dental personnel. J Dent 1995; 23(6):339-42.
5. Goodyear HM; McLeish P; Randall S; Buchan A; Skinner GR; Winther M; Rolland J; Morgan G; Harper JI. Immunological studies of herpes simplex virus infection in children with atopic eczema. Br J Dermatol 1996; 134(1):85-93.