

HSV-1/2-IgM-ELA Test PKS medac

Deutsch



HERSTELLER

medac

Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Fehlandtstraße 3
D-20354 Hamburg

VERTRIEB

medac

Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Geschäftseinheit Diagnostika
Theaterstraße 6
D-22880 Wedel

Tel.: ++49/ 4103/ 8006-351
Fax: ++49/ 4103/ 8006-359

BESTELLADRESSE

Tel.: ++49/ 4103/ 8006-111
Fax: ++49/ 4103/ 8006-113

HSV-1/2-IgM-ELA Test PKS medac

Enzymimmunoassay mit Pipettier-Kontroll-System zur Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen Herpes simplex-Virus 1 und 2 (HSV-1/2) in Serum

Katalog-Nr.: 104-PKS

ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

EINFÜHRUNG

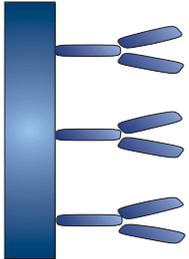
Das Herpes simplex-Virus (HSV) gehört zur Familie der humanpathogenen *Herpesviridae*. Es existieren zwei Typen, HSV-1 und HSV-2, deren genetische Homologie ca. 85 % beträgt. Die Typspezifität ist durch das Oberflächenglykoprotein G determiniert. Typisch für HSV ist ihre lebenslange latente Präsenz im Organismus nach Primärinfektion. Reaktivierungen treten in etwa 50 % der latent Infizierten auf und sind bei Immunsupprimierten deutlich häufiger. Heterologe und homologe Zweitinfektionen sind möglich. HSV sind weltweit verbreitet. In Deutschland liegt die Seroprävalenz bei Erwachsenen für HSV-1 bei > 90 %, für HSV-2 bei etwa 15 % mit steigender Tendenz.

Die Virusübertragung erfolgt durch Schleimhaut- bzw. Hautkontakt. Infektionen manifestieren sich orofazial (HSV-1) oder genital (überwiegend HSV-2). Eine typspezifische Lokalisation der Erkrankung ist jedoch nicht zwingend, da beide Virustypen Infektionen in beiden Körperregionen auslösen können.

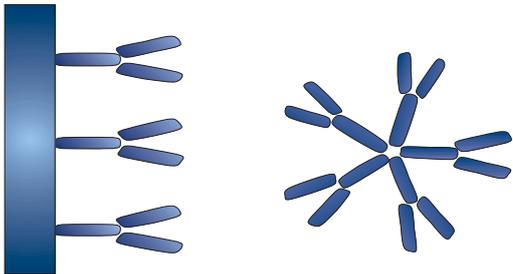
Die Diagnose in der symptomatischen/aktiven Phase der primären oder reaktivierten HSV-Infektion erfolgt in der Regel durch das klinische Bild bzw. durch den direkten Erregernachweis. HSV-Labordiagnostik wird hauptsächlich bei nicht eindeutigen Exanthenen, bei Verdacht auf Herpes-Enzephalitis, bei generalisierten Infektionen bei Immunsupprimierten und Neugeborenen und bei genitalen Infektionen in der Schwangerschaft durchgeführt. Die Bestimmung von Antikörpern dient hauptsächlich der Immunstatusbestimmung und ggf. zur Differenzierung zwischen früher Phase einer Infektion und Rekurrenz. Der Nachweis spezifischer IgM-Antikörper ist ein Hinweis auf Virusaktivität. Eine Differenzierung zwischen Primärinfektion und Reaktivierung ist über das IgM jedoch nicht möglich.

Der HSV-1/2-IgM-ELA Test PKS medac detektiert IgM-Antikörper im Serum, die gegen HSV-1 und/oder gegen HSV-2 gerichtet sind. Der Test ist schnell und einfach durchzuführen. Die Verwendung des μ -capture- und ELA-Prinzips ermöglicht eine hochspezifische und sensitive diagnostische Aussage.

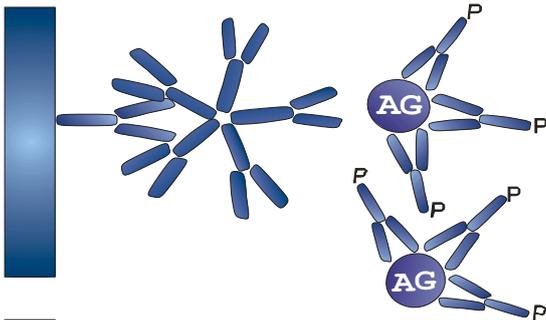
TESTPRINZIP



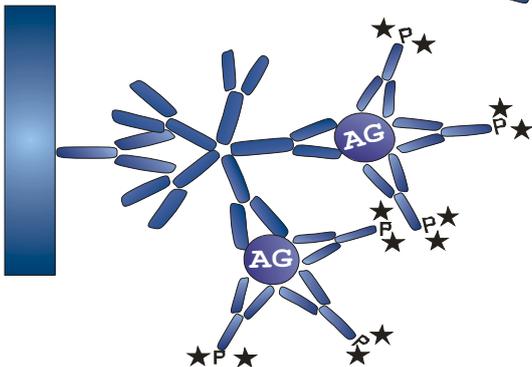
Mit Anti-Human-IgM beschichtete Mikrotiterplatte.



Die IgM-Fraktion aus dem Patientenserum wird auf der Mikrotiterplatte gebunden.



Der Komplex aus mAk-Peroxidase-Konjugat und HSV-Antigen bindet spezifisch an die HSV-1/2-IgM-Antikörper (AG = Antigen, P = Peroxidase).



Inkubation mit TMB-Substrat (*). Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure. Die Auswertung erfolgt photometrisch.

Testvorteile

- ☞ Keine unspezifischen Reaktionen und falsch positiven Ergebnisse durch Rheumafaktoren.
- ☞ Keine Blockade der IgM-Antikörper durch hohe IgG-Titer.
- ☞ Durch das Pipettier-Kontroll-System kann jeder einzelne Pipettierschritt durch Farbumschlag visuell überprüft werden.
- ☞ Die brechbaren Mikrotiterstreifen gewährleisten eine optimale Testauslastung.
- ☞ Automatisierbar auf offenen ELISA-Gerätesystemen.

PACKUNGSINHALT

KAT.- NR.: 104-PKS

1.

MTP

! Mikrotiterplatte: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen (bedruckt mit **HSM**, mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt), brechbar, Rundboden, beschichtet mit Ziege-Anti-Human-IgM-Antikörpern, BSA und pH-Indikator, gebrauchsfertig.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Negative Kontrolle: 1 Fläschchen à 1,5 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Positive Kontrolle: 1 Fläschchen à 1,5 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, enthält FKS, BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
4.

WB

Waschpuffer: 1 Flasche à 100 ml, PBS/Tween (10x), pH 7,2 - 7,4, enthält ProClin™ 300.
5.

VIR-DIL

Probenverdünnungspuffer: 1 Flasche à 110 ml, PBS/Tween/BSA, pH 7,2 - 7,4, gebrauchsfertig, enthält ProClin™ 300.
6.

ANTIGEN-DIL

Antigenverdünnungspuffer: 1 Fläschchen à 14 ml PBS/Tween, gebrauchsfertig, enthält ProClin™ 300.
7.

ANTIGEN

Antigen: 6 Fläschchen à 2,0 ml, HSV-Antigen/BSA/FKS, lyophilisiert.
8.

CON

Konjugat: 1 Fläschchen à 0,35 ml, Anti-HSV-IgG-Antikörper, monoclonal (Maus), HRP-konjugiert, gebrauchsfertig, rot gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
9.

TMB

TMB-Substrat: 1 Fläschchen à 10 ml, gebrauchsfertig.
10.

STOP

Stopplösung: 2 Fläschchen à 11 ml, 0,5 M Schwefelsäure (H₂SO₄), gebrauchsfertig.

1. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Material/Reagenz	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Testkit	ungeöffnet	2...8 °C	bis Verfalldatum
Mikrotiterplatte	geöffnet	2...8 °C im Beutel mit Trockenmittelpappe	6 Wochen
Kontrollen	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Waschpuffer	verdünnt	2...8 °C	6 Wochen
Probenverdünnungs- puffer	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Antigenverdünnungs- puffer	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Konjugat	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Antigen-Konjugat- Mischung	gebrauchs- fertig	RT	6 Stunden
TMB-Substrat	geöffnet	2...8 °C	6 Wochen
Stopplösung	geöffnet	2...8 °C	bis Verfalldatum

Die Reagenzien sind nach Ablauf des angegebenen Verfalldatums nicht mehr zu verwenden.

2. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- 2.1. Aqua ad iniectabilia (H₂O bidest.). Die Verwendung von entionisiertem Wasser kann zu Störungen im Testsystem führen.
- 2.2. Mikroliterpipetten für entsprechende Volumina.
- 2.3. Saubere Glas- oder Kunststoffgefäße zum Verdünnen von Waschpuffer und Proben.
- 2.4. Geeignete Vorrichtung zum Waschen der Mikrotiterplatte (z. B. Multistepper oder ELISA-Waschgerät).
- 2.5. Inkubator für 37 °C.
- 2.6. Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern für 450 nm und 620 - 650 nm.

3. ANSETZEN DER REAGENZIEN

Alle Kitkomponenten müssen vor Testansatz auf Raumtemperatur gebracht werden.

Ermitteln Sie die Anzahl der benötigten Mikrotitervertiefungen.

3.1. Mikrotiterplatte

Der Aluminiumbeutel muß nach jeder Entnahme zusammen mit der Trockenmittelpappe wieder fest verschlossen werden. Lagerung und Haltbarkeit der nicht verwendeten Mikrotitervertiefungen siehe unter 1.

Hinweis: Die Mikrotitervertiefungen weisen einen leicht grünlichen Farbton auf. Ggf. auftretende grünlich-braune Flecken in den Vertiefungen sind produktionsbedingt und stören den Test nicht.

3.2. Waschpuffer

1 Teil Waschpuffer (10x) wird mit 9 Teilen Aqua ad iniectabilia angesetzt (z. B. 50 ml Waschpuffer (10x) mit 450 ml Aqua ad iniectabilia). Für acht Vertiefungen werden 10 ml Waschpuffer benötigt.

Evtl. im Waschpuffer (10x) vorhandene Kristalle sind vor dem Ansetzen durch Erwärmen (max. 37 °C) und/oder Rühren bei RT in Lösung zu bringen.

3.3. Antigen-Konjugat-Mischung

Das lyophilisierte Antigen wird mit jeweils 2,0 ml **Antigenverdünnungspuffer** aufgelöst. Die verschlossenen Fläschchen werden leicht geschwenkt, so dass auch am Verschuß haftende Partikel in Lösung gebracht werden. 60 min vor Gebrauch werden 50 µl Konjugat zu 2,0 ml Antigen pipettiert.

Nach dem Auflösen und der Zugabe des Konjugats ist die Antigen-Konjugat-Mischung rot gefärbt und gebrauchsfertig.

Die gebrauchsfertige Antigen-Konjugat-Mischung ist 6 Stunden bei Raumtemperatur verwendbar (s. 1.).

Die testspezifischen Reagenzien (Mikrotiterplatte, Kontrollen, Konjugat, Antigen, Antigenverdünnungspuffer) sind nicht mit denen anderer Chargen zu mischen. Im Gegensatz dazu sind Probenverdünnungspuffer, Waschpuffer, TMB-Substrat und Stopplösung für alle virologischen Tests von medac grundsätzlich austauschbar.

Reagenzien anderer Hersteller sind generell nicht einzusetzen.

Nur bei exakter Einhaltung der Arbeitsvorschrift werden valide und reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

4. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

- 4.1. Der Test ist geeignet zur Untersuchung von Serum. Die Patientenproben können für 7 Tage bei 2 - 8 °C aufbewahrt werden.  Eine längere Lagerung sollte bei ≤ -20 °C erfolgen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Proben ist zu vermeiden.
- 4.2. Eine Vorbehandlung der Seren, wie z. B. Inaktivierung, ist nicht erforderlich, sie sollten jedoch nicht mikrobiell kontaminiert und frei von Humanerythrocyten sein.
- 4.3. Die Seren werden 1:100 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt.

5.A. ARBEITSVORSCHRIFT

- 5.1. Die Verpackung der Mikrotiterplatte am ZIP-Verschluß öffnen und die erforderliche Anzahl Mikrotitervertiefungen entnehmen (s. 3.1.).

Die Mikrotitervertiefungen sind gebrauchsfertig und müssen nicht vorgewaschen werden.

- 5.2. Die Vertiefung A1 bleibt frei für die Ermittlung des Leerwertes (s. 6.A.). Jeweils 50 µl der Proben sowie in Doppelbestimmung negative Kontrolle und positive Kontrolle in die Vertiefungen der Platte pipettieren.

Nach dem Pipettieren der Proben (pH-neutrale bzw. basische Flüssigkeiten) kommt es zu einer Blaufärbung. Erfolgt in einer Vertiefung kein Farbumschlag, so ist dies ein Hinweis darauf, dass keine Probe bzw. keine Kontrolle pipettiert wurde.

Ggf. kann die Platte bis zur weiteren Bearbeitung für maximal 30 min bei RT gelagert werden.

- 5.3. Die Mikrotitervertiefungen 60 min (± 5 min) bei 37 °C (± 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.4. Ansetzen der Antigen-Konjugat-Mischung (s. 3.3.).
- 5.5. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen dreimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer waschen. Darauf achten, dass alle Vertiefungen beim Waschen gefüllt werden. Nach Beendigung des Waschvorganges Mikrotitervertiefungen auf Filterpapier ausklopfen.

Nicht austrocknen lassen! Umgehend weiterverwenden!

- 5.6. Antigen-Konjugat-Mischung (rot gefärbt) in alle Vertiefungen (außer A1) pipettieren.

Beim manuellen Abarbeiten des Tests werden 50 µl ELA pro Vertiefung pipettiert.

Bitte beachten:

Beim Arbeiten mit automatisierten Gerätesystemen ist auf Grund der höheren Verdunstung in den Inkubationskammern die Zugabe von 60 µl Antigen-Konjugat-Mischung pro Vertiefung zu programmieren.

Die grundsätzliche Eignung des Tests für die automatisierte Abarbeitung konnte im Rahmen der Validierung gezeigt werden. Dennoch empfehlen wir, die Kompatibilität mit dem zum Einsatz kommenden Gerätesystem zu verifizieren.

- 5.7. Erneut 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.8. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen erneut waschen (s. 5.5.).
- 5.9. 50 µl TMB-Substrat in jede Vertiefung (auch A1) pipettieren und 30 min (\pm 2 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) im Dunkeln inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt). Positive Proben erscheinen blau gefärbt.
- 5.10. Durch Zugabe von 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung (auch A1) wird die Reaktion gestoppt. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb.

Mikrotitervertiefungen vor photometrischer Messung von unten abwischen und darauf achten, dass keine Luftblasen in den Vertiefungen vorhanden sind.

Die Messung ist innerhalb von 15 min nach dem Stoppen durchzuführen.

5.B. TABELLE ZUR ARBEITSVORSCHRIFT

	Leerwert (A1)	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle	Probe
Negative Kontrolle	-	50 µl	-	-
Positive Kontrolle	-	-	50 µl	-
Probe	-	-	-	50 µl
60 min bei 37 °C inkubieren, 3x mit 200 µl Waschpuffer waschen				
Antigen-Konjugat- Mischung	-	50/60 µl*)	50/60 µl*)	50/60 µl*)
60 min bei 37 °C inkubieren, 3x mit 200 µl Waschpuffer waschen				
TMB-Substrat	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren				
Stopplösung	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometrische Auswertung bei 450 nm (Ref. 620 - 650 nm)				

*) manuelle/automatisierte Abarbeitung (s. 5.6.)

6.A. TESTBEURTEILUNG (VALIDITÄT)

- * Die photometrische Auswertung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620 - 650 nm).
- * Die OD des Leerwertes (Vertiefung A1) wird von allen OD-Werten subtrahiert.
- * Der OD-Mittelwert der **negativen Kontrolle** muss **< 0,150** betragen. Der OD-Mittelwert der **positiven Kontrolle** muss **> 0,450** betragen.
- * **Cut-off = OD-Mittelwert der negativen Kontrolle + 0,140**
- * **Grenzbereich = Cut-off ± 10 %**

Sind die genannten Validitätskriterien nicht erfüllt, muss der Test wiederholt werden.

6.B. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE/GRENZEN DER METHODE

- * Proben mit OD-Werten unterhalb des Grenzbereiches werden als **NEGATIV** bewertet.
- * Proben mit OD-Werten innerhalb des Grenzbereiches werden als **GRENZWERTIG** bewertet. Diese Werte sollten kontrolliert werden, indem nach 14 Tagen eine zusätzliche Patientenprobe entnommen wird, die zusammen mit der ersten Probe auf eine Titerbewegung untersucht wird.
- * Proben mit OD-Werten oberhalb des Grenzbereiches werden als **POSITIV** bewertet.
- * Die Testergebnisse sollten stets im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der Patienten sowie den HSV-1/2-IgG-, den HSV-2-IgG-Ergebnissen und ggf. weiteren diagnostischen Parametern interpretiert werden.

Bei Verdacht auf eine HSV-1/2-Primärinfektion während der Schwangerschaft ist eine weiterführende Diagnostik, z.B. PCR, erforderlich.

- * Kreuzreaktivitäten, die durch Antikörper gegen andere Herpesviren hervorgerufen werden, können in Einzelfällen nicht ausgeschlossen werden.
- * Ein Einfluß hämolytischer Seren auf das Testergebnis wurde nicht festgestellt.

7. LEISTUNGSMERKMALE

Die nachfolgenden Leistungsmerkmale wurden von uns im Rahmen der diagnostischen Evaluierung ermittelt.

7.A. SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Im Rahmen der diagnostischen Erprobung wurden 468 Proben (270 aus dem Labor Prof. Enders und Kollegen und 198 Blutspenderseren aus Hannover und Suhl) im Vergleich zur Sollbewertung gemessen. Die Sollbewertung wurde mit zwei unterschiedlichen ELISA als Referenz festgelegt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Neun-Felder-Tafel dargestellt:

		Sollbewertung		
		negativ	grenzwertig	positiv
HSV-1/2-IgM-ELA Test PKS medac	negativ	409	0	9
	grenzwertig	0	0	0
	positiv	0	0	50

Spezifität = 100 %
Sensitivität = 84,7 %

Übereinstimmung: 98,1 %

7.B. PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz			
	MW OD	S	VK (%)	n		MW OD	S	VK (%)	n
NK	0,038	0,003	8	22	NK	0,050	0,011	22	11
GW	0,313	0,008	3	22	GW	0,360	0,036	10	11
PK	0,562	0,017	3	22	PK	0,705	0,088	12	11
Nr. 1	0,035	0,002	6	22	Nr. 6	0,033	0,007	21	11
Nr. 2	0,073	0,005	7	22	Nr. 7	0,098	0,013	13	11
Nr. 3	0,417	0,017	4	22	Nr. 8	0,505	0,054	11	11
Nr. 4	0,609	0,020	3	22	Nr. 9	0,734	0,061	8	11
Nr. 5	1,257	0,027	2	22	Nr. 10	1,365	0,103	8	11

NK = negative Kontrolle; GW = schwach positive Kontrolle (nicht im Kit enthalten);
PK = positive Kontrolle

ALLGEMEINE HANDHABUNGSHINWEISE

- * Reagenzienflaschen und deren Verschlüsse nicht vertauschen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- * Sofort nach Gebrauch die Reagenzflaschen wieder fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- * Nach Gebrauch sind die Reagenzien sofort wieder, entsprechend den vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen, zu lagern, um die angegebene Haltbarkeit zu gewährleisten.
- * Um Verwechslungen mit Reagenzien anderer Testsysteme oder Chargen zu vermeiden, sollten alle Kitkomponenten einer Testpackung nach dem Gebrauch zusammen in der Originalpackung gelagert werden (siehe auch 3.).

SICHERHEITSHINWEISE

- * Die national verbindlichen Arbeitsschutzvorschriften sind zu beachten.
- * Die Reagenzien humanen Ursprungs wurden auf HBsAg, Anti-HIV 1/2 und Anti-HCV untersucht und für nicht reaktiv befunden. Dennoch sollten diese Reagenzien, wie auch jene, die Bestandteile tierischer Herkunft enthalten (siehe Packungsinhalt), als potentiell infektiös behandelt werden, um das Risiko einer Ansteckung zu vermeiden.

ENTSORGUNGSHINWEISE

Die in diesem Produkt enthaltenen Chemikalien und Zubereitungen sowie die bei der Anwendung dieses Produktes anfallenden Reste sind in der Regel Abfälle, die einer ordnungsgemäßen Entsorgung zugeführt werden müssen.

Die Entsorgung solcher Abfälle unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde oder Abfallentsorgungsunternehmen informieren über die Entsorgungsmöglichkeiten.

Ausgabedatum: 01.05.2012

LITERATUR

Ashley, R.L., Wald, A.: Genital herpes: Review of the epidemic and potential use of type-specific serology. Clin Microbiol Rev 12(1), 1-8 (1999)

Bergström, T., Trybala, E.: Antigenic differences between HSV-1 and HSV-2 glycoproteins and their importance for type-specific serology. Intervirology 39,176-184 (1996)

Kimberlin, D.W.: Neonatal Herpes simplex Infection. Clin Microbiol Rev 17(1), 1-13 (2004)

Kriebs, I.M.: Understanding Herpes simplex virus: Transmission, diagnosis and considerations in pregnancy management. Midwifery Womens Health 53(3), 202-208 (2008)

Mertens, T., Haller, O., Klenk, H.-D. (Hrsg.): Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten. 126-137, Urban & Fischer Verlag (2004)

Petersen. E.E., Doerr, H.W., Gross, G., Petzoldt, D., Weissenbacher, E.R., Wutzler, P.: Der Herpes genitalis. Dt Ärztebl 96, Heft 38, A-2358-2364 (1999)

Sauerbrei, A., Wutzler, P.: Herpes simplex and varicella-zoster virus infections during pregnancy. Current concepts of prevention, diagnosis and therapy. Part 1: Herpes simplex virus infections. Med Microbiol Immunol 196(2), 89-94 (2007)

Wutzler, P., Sauerbrei, A., Eichhorn, U.: Virologische Diagnostik der Herpes simplex-Virus-Enzephalitis. Mikrobiologie 9, 11-15 (1999)

Wutzler, P., Doerr, H.W., Färber, I., Eichhorn, U., Helbig, B., Sauerbrei, A.: Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in selected German populations - relevance for incidence of genital herpes. J Med Virol 61, 201-207 (2000)