



ENZYWELL

HSV 2 SCREEN

REF 91019 (96 tests)

Manufactured by: DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy

INDICE / INDEX

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / UTILISATION
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / INTERET CLINIQUE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / PRINCIPE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / CONTENU DU COFFRET ET PREPARATOIN DES REACTIFS
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / MODALITE DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / PRECAUTIONS D'UTILISATION
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / TYPE D'ECHANTILLON
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / MODE OPERATOIRE
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / SCHEMA D'ANALYSE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / VALIDATIAON OF THE TEST / VALIDATION DU TEST
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETATION DES RESULTATS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA /LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / LIMITES DE LA METHODE
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / SPECIFICITE ANALYTIQUE
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUE
15. PRECISIONE / PRECISION
16. GUIDA AI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING"
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / BIBLIOGRAPHIE



ISTRUZIONI PER L'USO

ENZYWELL HSV-2 SCREEN

REF 91019

1. UTILIZZAZIONE:

METODO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DELLE IMMUNOGLOBULINE ANTI HERPES SIMPLEX VIRUS (TIPO 2) NEL SIERO UMANO.

2. INTRODUZIONE:

Herpes simplex virus (HSV) è un membro della famiglia degli Herpesviridae del quale si conoscono due tipi: il tipo 1 (HSV-1) ed il tipo 2 (HSV-2), che si distinguono per differenze antigeniche minori. HSV-1 è responsabile principalmente di lesioni oro-facciali, mentre HSV-2 di lesioni genitali, ma questa distinzione è solo approssimativa ed entrambi i tipi possono essere responsabili di infezione in ambedue le sedi. Inoltre HSV può essere responsabile di una forma di cheratite oculare e di danni a carico del sistema nervoso centrale.

HSV colpisce virtualmente tutta la popolazione. L'infezione primaria è spesso subclinica e raramente viene diagnosticata. Dopo un periodo di latenza di durata variabile, si possono avere fenomeni di riattivazione con replicazione virale accompagnata o no da lesioni cliniche. Particolare interesse riveste l'infezione contratta alla nascita, in quanto responsabile di una considerevole morbidità e mortalità.

Può essere perciò importante la valutazione dello stato immunitario della donna durante la gravidanza al fine di rilevare una eventuale sierconversione.

3. PRINCIPIO DEL METODO:

Il test per il dosaggio delle immunoglobuline (Ig totali) anti Herpes Simplex Virus (Tipo 2) si basa sul principio dell'analisi per competizione. Gli anticorpi anti-HSV-2 presenti nel campione in esame competono con il tracciante (anticorpi monoclonali anti-HSV-2 coniugati con perossidasi) per occupare i siti leganti, disponibili in numero limitato, dell'antigene fissato sulla fase solida. Maggiore è la concentrazione degli anticorpi nel campione in esame, minore è la quantità di anticorpi coniugati che si legano. Le componenti non legate vengono eliminate mediante lavaggio e l'attività enzimatica legata viene valutata colorimetricamente per trasformazione di un substrato cromogenico (reazione di colore azzurro che vira al giallo dopo l'aggiunta del reattivo Stop). L'intensità di colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione degli anticorpi nel campione in esame.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.

- **Portare i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE MICROPIASTRA. 6 x 16 pozzetti sensibilizzati con Herpes Simplex Virus (Tipo 2).

Uso: Aprire l'involucro delle strips dalla parte opposta al codice (D seguita dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto ed inserire i pozzetti necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

CAL CALBRATORE (0.8 mL).

Contenuto: Siero di bue in tampone fosfato 0,01 mol/L con fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%, liquido, pronto all'uso

CONJ CONJUGATE. 2 x 8 mL.

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti HSV-2 marcati con perossidasi in tampone fosfato con fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%. Pronto all'uso.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603). 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5%.

Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata o deionizzata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619). 1 x 12 mL. Pronto all'uso. **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
 Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H₂O₂ 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602). 1 x 16 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**
 Soluzione di H₂SO₄ 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO.

- Incubatore a 37°-40°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm, con linearità fino ad OD >= 2,000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi compresi nel range 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 ul di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull' etichetta esterna della confezione.

I Reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

REAGENTE	CONDIZIONI
MICROPIASTRA	6 SETTIMANE 2/8°C busta di polietilene
CALIBRATORE	1 SETTIMANA a t.a.
CONIUGATO	1 SETTIMANA a t.a.
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C , 1 settimana a 15/30°C; conservare al buio
WASH BUFFER	p. uso 2 settimane 2/8°C 5 giorni 15/30 °C
STOP SOLUTION	fino alla scadenza a 2/8°C

6. PRECAUZIONI:

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
2. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
 - a) Il tampone di lavaggio contiene detergenti
 - b) Il coniugato ed i controlli contengono fenolo
 - c) Il substrato è acido
 Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
3. Le apparecchiature non disposable devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1 h a 121°C; i disposables devono essere autoclavati o inceneriti.
4. L'acido solforico contenuto nello Stop Solution e l'acido cloridrico 2 M usato per lavare la vetreria sono corrosivi; tali sostanze devono essere adoperate con cautela. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulito, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. La OD del calibratore e dei campioni può essere leggermente diversa fra piastre diverse. Quindi, se si utilizzano nella stessa seduta delle strips da piastre diverse anche se dello stesso lotto, è necessario ripetere il calibratore.
2. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso.
3. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
4. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
5. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
6. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
7. Evitare che i pozzetti si seccino durante il test.
8. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso con il substrato e con il coniugato.
9. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
10. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO₂.
11. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
12. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato, plasma contenente fibrina o campioni che presentano inquinamento microbico.
13. Evitare la contaminazione dei pozzetti con la polvere da guanti monouso.
14. L'uso del kit con strumento automatici deve essere validato dall'utilizzatore.
15. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
 - installazione e requisiti particolari
 - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
 - specifiche del produttore e performance dello strumento
 - manutenzione e assistenza tecnica.

7. TIPO DI CAMPIONI E CONSERVAZIONE:

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto per normale venipuntura e maneggiato con appropriati accorgimenti come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C per periodi maggiori a -20°C e può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima del dosaggio. L'inattivazione al calore può fornire risultati erranei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei. Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati. Se non è possibile il prelievo di un campione fresco, i campioni dovrebbero essere chiarificati mediante filtrazione (0,45 µm) o centrifugazione (3000 rpm x 10').

Il test non è applicabile al plasma umano.

8. PROCEDIMENTOPREPARAZIONE

Prima dell'inizio del test, portare tutti i reagenti ed i campioni in esame a temperatura ambiente (da +18°C a +25°C).

Preparazione del tampone di lavaggio: 18 mL di acqua distillata + 2 mL Wash Buffer 10x per strip

ESECUZIONE DEL TEST

Il valore di estinzione del calibratore, come pure dei campioni in esame, può essere leggermente diverso da piastra a piastra. Pertanto, se per una stessa serie di test vengono utilizzati strip provenienti da piastre diverse, anche appartenenti allo stesso lotto, per una corretta valutazione dei campioni in esame è necessario ripetere il calibratore.

1. Distribuzione dei campioni:

Dispensare 30 µL di calibratore in un pozzetto della piastra (meglio in duplicato) e 30 µL dei campioni in esame nei rimanenti pozzetti.

Aggiungere in tutti i pozzetti 100 µL di coniugato. Agitare accuratamente.

2. Incubazione:
Incubare la piastra coperta con foglio adesivo a 37°C per 90 minuti.
3. Lavaggio:
Rimuovere il foglio adesivo, aspirare il contenuto di tutti i pozzetti e lavare 4 volte riempiendo ciascun pozzetto con 300 µL di soluzione di lavaggio. Attendere 30" prima di ogni lavaggio.
4. Distribuzione del substrato:
Dispensare 100 µL di substrato per ogni pozzetto.
5. Incubazione del substrato:
Incubare la piastra per 15 minuti a temperatura compresa tra 18 e 25°C.
6. Arresto della reazione:
Dispensare 100 µL di soluzione bloccante seguendo lo stesso ordine di aggiunta del punto 4.
7. Lettura:
Leggere fotometricamente entro 30 minuti a 450 nm.

9. Schema del protocollo di prova per HSV-2 SCREEN

STEP 1	Mettere 30 µL di calibratore e siero campione nei pozzetti dello strip e aggiungere 100 µL di coniugato. Agitare. <input type="checkbox"/> incubare 90 min. a 37°C <input type="checkbox"/> lavare 4 volte (300 µL) <input type="checkbox"/>
STEP 2	mettere 100 µL di Substrato per pozzetto <input type="checkbox"/> incubare 15 min. a 18-25°C <input type="checkbox"/>
STEP 3	aggiungere 100 µL di Stop Solution <input type="checkbox"/> leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

O.D. Calibratore ≥ 0.6 a 450 nm o ≥ 0.56 a 450/620 nm.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Il cut-off si calcola moltiplicando la D.O. del Calibratore per un fattore riportato sull'etichetta.

Es: Calibratore: D.O. = 1,100 **Fattore = 0,6**
Cut-Off = 1,100 x 0,6 = 0,66

Se il valore dell'assorbanza del campione è minore del Cut-Off, il campione è positivo per la presenza di immunoglobuline anti-Herpes Simplex Virus (tipo 2).

E' consigliabile che ogni risultato positivo sia confermato ripetendo il test. Se la ripetizione non conferma il primo risultato, è valido questo secondo test. Se il secondo risultato è dubbio si consiglia di ripetere il test su un nuovo campione.

12. LIMITAZIONI DEL TEST

Il test non è in grado di discriminare la presenza di IgG da quella delle IgM.

Il test non può essere utilizzato da solo per una diagnosi clinica. Un risultato negativo non preclude la eventualità di un'infezione.

Devono essere seguiti i capitoli PROCEDIMENTO e INTERPRETAZIONE DEL TEST.

Con qualsiasi metodo immunoenzimatico si possono avere dei risultati non ripetutamente reattivi.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

La presenza di anticorpi anti-CMV, EBV, Rubella, Parotite non altera le prestazioni del test.

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

Sono stati analizzati 217 campioni in parallelo con altri kit commerciali. I campioni dubbi in comune sono stati considerati positivi. Si sono ottenuti i seguenti risultati:

	Altri metodi	
	POS	NEG
DIESSE POS	30	2
NEG	11	174

La specificità diagnostica risulta essere 99% (IC al 95% 96-100%) e la sensibilità diagnostica risulta essere del 73% (IC al 95%, 59-95%).

15. PRECISIONE

Tab. 1 Precisione nella prova

Campione	N	D.O.	CV%
Cal. Neg.	16	1.146	6
1 (neg)	4	0.778	8
2 (pos. debole)	4	0.249	5
3 (pos.)	4	0.1	4

Tab. 2 Precisione tra prove e tra lotti (n=3)

	D.O. Campione/Cut-off			Media	D.S.	CV%
Neg	1.193	1.131	0.143	1.156	0.03	3
Pos. Debole	0.485	0.362	0.404	0.417	0.06	15
Pos.	0.205	0.145	0.172	0.174	0.03	17

16. GUIDA AI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBILI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi istruzioni per l'uso punto 4 per il codice corretto).
Seduta invalida (tutti positivi)	Inquinamento del substrato	Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test.
	Lavaggio inadeguato	Prelevare una nuova aliquota del substrato. Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
Scarsa precisione	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Errore del pipettamento	Controllare il funzionamento della pipetta
	Aggiunta dei reagenti troppo lenta	Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente.
	Presenza di bolle d'aria	Evitare la formazione di bolle d'aria durante il pipettamento
	Percorso ottico non limpido	Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con

		fazzoletto di carta.
Insufficiente sviluppo di colore	Tempo o temperatura di incubazione non corretto	Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione
		Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

17. BIBLIOGRAFIA

1. W.E. Rawls et al. Measurement of antibodies to herpesvirus types 1 and 2 in human sera. J. Immunol. 104: 599 (1970).
2. J.J. Gibson et al. A cross-sectional study of herpes simplex virus types 1 and 2 in college students: occurrence and determinants of infection. J. Inf. Dis. 162: 306 (1990).
3. R.M. Coleman et al. Determination of Herpes Simplex Virus antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 18: 287 (1983).



DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) Italy.
Tel. 0577-587111

NIESSE

INSTRUCTIONS FOR USE

**ENZYWELL
 HSV-2 SCREEN**

REF 91019

1. INTENDED USE:

IMMUNOENZYMATIC METHOD FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IMMUNOGLOBULINS AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS (TYPE 2.1) IN HUMAN SERUM.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST:

The Herpes simplex virus (HSV) is a member of the Herpesviridae family, of which two types are known: type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) which present slight antigenic differences. HSV-1 causes chiefly oral-facial lesions, while HSV-2 is mainly responsible for genital lesions, but this distinction is not binding, both types occasionally causing infection in either anatomical site. HSV may also cause a form of ocular cheratitis, and lesions of the central nervous system.

HSV can affect practically the whole population. The primary infection is often in a subclinical form and is rarely diagnosed. After a latency period of variable duration, reactivation may occur and viral replication may or may not give rise to clinical lesions. Infection contracted during birth is of particular interest, this being an important cause of morbidity and mortality. It is therefore important to determine the immunitary state of women during pregnancy in order to detect serum conversion.

3. PRINCIPLE OF THE TEST:

The test for the assay of anti-Herpes Simplex Virus (HSV) type 1 immunoglobulins (total Ig) is based on the principle of analysis by competition. The anti-HSV-2 antibodies present in the sample compete with the marker (human IgG anti-HSV-2 conjugated with peroxydase) to occupy the few binding sites available on the antigen coated on the solid phase. The higher the antibody concentration in the sample, the lower the number of conjugated antibodies which are bound. The unbound components are eliminated by washing, and the bound enzymatic activity is determined colorimetrically by transformation of a chromogen substrate (the blue colouring of the reaction turns yellow after the addition of the Stop reagent). The intensity of the colour which develops is inversely proportional to the antibody concentration in the sample.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION:

- Reagents are sufficient for 96 determinations.
- **Bring reagents to room temperature before use.**

MT PLATE MICROPLATE. 6 x 16 wells coated with HSV Type 2.1.

Use: open the package at the opposite end from the code (D followed by the lot number) which is useful for identification purposes, remove the support and wells to be used from the foil package, and place the unused wells in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

CAL CALIBRATOR. 1 x 0.8 mL.

Contents: Bovine serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%, liquid, ready for use.

CONJ CONJUGATE. 2 x 8 mL. Ready for use.

Contents: anti-HSV-2 monoclonal antibodies labelled with Peroxydase, in phosphate buffer with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X (PF93603). 1 x 100 mL. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**

Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5%.

Preparation: dilute the required volume 1:10 with distilled or deionized water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619). 1 x 12 mL. Ready for use. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
 Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and hydrogen peroxide 0.01% stabilized in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8).

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602). 1x16 mL. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**.
 H₂SO₄ 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).
 POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.

- Incubator at 37°C
- Microplate reader, wavelength 450 or 450/620 nm, with OD linearity up to 2,000 (at least).
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µl
- Distilled or deionized water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue.

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

REAGENT	CONDITIONS
MICROPLATE	6 weeks at 2/8°C in the polythene bag
CALIBRATORE	1 week at room temperature
CONJUGATE	1 week at room temperature.
SUBSTRATE	until the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C in the dark
WASH BUFFER	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
STOP SOLUTION	until the expiry date at 2/8°C

6. PRECAUTIONS AND WARNINGS:

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE. STORE AT 2-8°C.

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
 - a) The Wash Buffer contains detergents
 - b) The conjugate and controls contain phenol
 - c) The substrate is acid.
 If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
3. Non-disposable apparatus should be sterilized after use. The preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C; disposables should be autoclaved or incinerated.
4. Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid 2 M used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If they come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
5. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical precautions

1. The extinction value of the calibrator, and also of the samples, may differ slightly from plate to plate. Therefore, if strips taken from different plates, even if from the same batch, are to be used in the same run, the calibrator must be repeated.
2. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature.
3. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
4. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
5. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
6. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
7. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
8. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for use with the substrate and for use with the conjugate.
9. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
10. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO₂ incubators must not be used.
11. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
12. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, plasma samples containing fibrin or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
13. Avoid contaminating microwells with the dust from disposable gloves.
14. Use of the kit with automatic instruments must be validated by the user.
15. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:
 - installation and particular requisites
 - operating principles, instructions, precautions and risks
 - manufacturer's specifications and instrument performance
 - servicing and maintenance.

7. TYPE OF SPECIMENS AND STORAGE:

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at -20°C, and can be thawed a maximum of 3 times. Defrosted samples must be carefully mixed before performing the test. Heat inactivation can lead to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided. If a new sample cannot be obtained, such samples should be clarified by filtration (0.45 µm) or centrifugation (3000 rpm x 10').

The test is not applicable to human plasma.

8. TEST PROCEDURE:PREPARATION

Before testing, bring all reagents and samples to room temperature (18-25°C).

Preparation of Washing buffer: 18 mL of distilled water + 2 mL Wash Buffer 10x per strip.

EXECUTION OF THE TEST

The extinction value of the calibrator, and also of the samples, may differ slightly from plate to plate. Therefore, if strips taken from different plates, even if from the same batch, are to be used in the same test, for a correct evaluation of the samples being tested the calibrator should be repeated.

1. Distribution of the samples:
Dispense 30 µL of calibrator in a well on the plate (preferably in duplicate), and 30 µL of the samples being tested in the remaining wells.
Add 100 µL of conjugate to each well. Mix carefully.

2. Incubation:
Incubate the plate covered with the adhesive foil at 37°C for 90 minutes.
3. Rinsing:
Remove the adhesive film, aspirate the contents of all the wells and rinse 4 times, filling each well with 300 µL of washing solution. Wait 30" between each wash.
4. Distribution of the substrate:
Dispense 100 µL of the substrate in each well.
5. Substrate incubation:
Incubate the plate for 15 minutes at room temperature (18-25°C).
6. Interruption of the reaction:
Dispense 100 µL of blocking solution, in the same order as that followed for point 4.
7. Reading:
Take the photometric readings within 30 minutes at 450 nm.

9. TEST PROCEDURE FOR HSV-2 SCREEN

- STEP 1 Place 30 µL of calibrator and serum sample in the wells of the strips and add 100 µL of conjugate.
Mix well.
- Incubate for 90 min. at 37°C
- Wash 4 times (300 µL)
- STEP 2 Place 100 µL of Substrate in each well
- Incubate for 15 min. at room temperature
- STEP 3 Add 100 µL of Stop Solution
- Read absorbance at 450 nm within 30 min

10. VALIDATION OF THE TEST

O.D. Calibrator \geq 0.6 at 450 nm or \geq 0.56 at 450/620 nm.

11. INTERPRETATION OF THE TEST

The Cut-Off is calculated by multiplying the O.D. of the Calibrator by a factor which is reported on the label.

Example: Calibrator: O.D. = 1.100 **Factor = 0.6**
Cut-Off = 1.100 x 0.6 = 0.66.

If the absorbance value of the sample is lower than that of the Cut-Off, the sample is positive for the presence of anti-HSV type 1 immunoglobulins.

It is advisable to confirm each positive result by repeating the test. If this second analysis does not confirm the first, the latter is considered valid and the sample is negative. If the second result is doubtful, a new sample should be tested.

12. LIMITATIONS

The test is not able to discriminate between the presence of IgG and that of IgM.

The test cannot be used on its own for clinical diagnostic purposes. A negative result does not exclude the possibility of the disease.

The Test Procedure and Interpretation of the Test must be followed. Non-repeatable reactive results may be obtained with any EIA procedure.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

The presence of anti-CMV, anti-EBV, anti-Rubella or anti-Mumps antibodies does not alter the kit's performance.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

217 samples were analysed in parallel with other commercial kits. Samples found to be doubtful in all the tests were considered as positive. The following results were obtained:

	OTHER METHODS	
	POS	NEG
DIESSE POS	30	2
NEG	11	174

The diagnostic specificity was 99% (IC at 95% 96-100%) and the diagnostic sensitivity was 73% (IC at 95%, 59-95%).

15. PRECISION

Table 1 "In run" Precision

Sample	N	O.D.	CV%
Neg. Calibrator	16	1.146	6
1 (neg)	4	0.778	8
2 (wak pos.)	4	0.249	5
3 (pos.)	4	0.1	4

Tab. 2 Precision between runs and between lots (n=3)

	O.D. Sample/Cut-off			Media	S.D.	CV%
Neg	1.193	1.131	0.143	1.156	0.03	3
Weak pos.	0.485	0.362	0.404	0.417	0.06	15
Pos.	0.205	0.145	0.172	0.174	0.03	17

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

PROBLEM	POSSIBLE SOURCE	TEST OR ACTION
Invalid run (all negative)	One or more reagents not added or added in wrong sequence	Recheck procedure Check for unused solutions. Repeat test.
	Unreactive plate	Check the code on the package containing the plate (see package insert point 4 for correct code). Check for moisture in unused plate. (Silica gel dessiccant must be pale yellow). Repeat test
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Take new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that wash apparatus works well
Poor precision	Incomplete washing of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Inadequate aspiration of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Reagent addition too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of bubbles	Avoid air bubbles during pipetting.
	Optical pathway not clean	Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft

		tissue.
Inadequate Color development	Incorrect incubation times or temperature	Check for temperature control and time monitoring
		Adhere to recommended instruction for use.
	Inadequate volume of substrate added to the plate	Check pipette function.

17. REFERENCES

1. W.E. Rawls et al. Measurement of antibodies to herpesvirus types 1 and 2 in human sera. J. Immunol. 104: 599 (1970).
2. J.J. Gibson et al. A cross-sectional study of herpes simplex virus types 1 and 2 in college students: occurrence and determinants of infection. J. Inf. Dis. 162: 306 (1990).
3. R.M. Coleman et al. Determination of Herpes Simplex Virus antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 18: 287 (1983).



DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) Italy.
Tel. 0577-587111