

NovaLisa™

Herpes Simplex Virus 1 (HSV 1)

IgG – ELISA

CE

1. INTRODUCTION

Herpès simplex est un virus d'ADN enveloppé (150-200 nm de diamètre) appartenant aux alpha-herpesviridae. Basé sur des différences antigéniques, biochimiques et biologiques Herpès simplex peut être divisé en deux sérotypes, HSV-1 et HSV-2. L'homme est le seul hôte naturel et la seule source connue du virus. HSV-1 cause l'herpès buccal, alors que le HSV-2 affecte la région génitale. HSV-1 et HSV-2 sont inactifs pour la plupart du temps, ou "silencieux", et ne causent aucun symptôme, mais quelques personnes infectées ont des "manifestations" de boursouffures et d'ulcères. Une fois infecté avec HSV, les gens restent infectés pendant la vie. Les virus d'herpès simplex sont parmi les agents infectieux les plus communs, et l'un ou l'autre type d'HSV semble être capable d'infecter des parties du corps semblables à plusieurs reprises. Un pourcentage élevé de la population adulte est séropositif (environ 90% HSV-1, et, selon les conditions socio-économiques, 10-30% HSV-2). D'habitude, l'infection primaire d'HSV-1 se produit tôt dans l'enfance (6 à 18 mois d'âge). HSV-2 produit généralement des symptômes doux, et la plupart des personnes n'ont aucun symptôme identifié. Parmi les groupes à risque sont des enfants avec une insuffisance immunitaire héréditaire (cellule-T), et des patients qui sont immuno- supprimés en raison d'une infection (par exemple HIV), d'une transplantation, ou d'une thérapie de cancer.

Espèce	La maladie	Symptômes	Mécanisme de l'infection
HSV-1 (herpès labialis)	Herpès buccal gingivostomatite herpétique primaire; complications : kératite herpétique et encéphalite herpès labialis récurrent	Vésicules multiples dans les membranes muqueuses orales Boursouffures de fièvre sur la bouche ou le visage	Transmission par infection de gouttelettes

La présence d'une infection peut être identifiée par

- Microscopie : CPE, IF
- PCR
- Sérologie : Détection des anticorps par ELISA

2. UTILISATION PRÉVUE

L'ELISA d'IgG HSV-1 de NovaTec est prévu pour la détermination qualitative des anticorps IgG contre HSV-1 en sérum humain ou plasma (citrate).

3. PRINCIPE DE L'ANALYSE

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps IgG contre HSV-1 est basée sur la technique d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Des puits dans les bandes du plaque microtitre sont recouvertes de protéine recombinante gG1 pour attacher les anticorps correspondants du spécimen. Après le lavage des puits ayant pour but d'enlever l'échantillon détaché, l'anti-humain IgG conjugué à HRP (horseradish peroxidase) est ajouté. Ce conjugué s'attache aux anticorps spécifiques pour HSV-1. Le complexe immun constitué par le conjugué attaché est visualisé en ajoutant le substrat de Tetraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgG spécifiques pour HSV-1 dans le spécimen. De l'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. L'absorbance à 450 nm est lue en utilisant un lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA.

4. MATÉRIAUX

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'HSV-1 (IgG) :** 12 bandes cassables contenant 8 puits recouvertes de protéine recombinante gG1 ; en sachets d'aluminium refermables.
- **Diluant de l'échantillon IgG *** :** 1 bouteille contenant 100 ml d'amortisseur pour la dilution de l'échantillon ; pH 7.2 ± 0.2 ; coloré jaune ; prêt à utiliser ; couvercle blanc.
- **Solution D'Arrêt :** 1 bouteille contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.2 mol/l ; prêt à utiliser ; couvercle rouge.
- **Solution de lavage (20x concentré) * :** 1 bouteille contenant 50 ml d'un amortisseur 20-fois concentré (pH 7.2 ± 0.2) pour laver les puits ; couvercle blanc.
- **Conjugué anti-IgG HSV-1 ** :** 1 bouteille contenant 20 ml d'anticorps de lapin conjugués à peroxydase contre l'IgG humain ; coloré bleue, prêt à utiliser ; couvercle noir.
- **Solution de substrat de TMB :** 1 bouteille contenant 15 ml 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB) ; prêt à utiliser ; couvercle jaune.
- **Contrôle positif d'IgG HSV-1 *** :** 1 bouteille contenant 2 ml ; coloré jaune ; prêt à utiliser ; couvercle rouge.
- **Contrôle cut-off d'IgG HSV-1 *** :** 1 bouteille contenant 3 ml, coloré jaune; prêt à utiliser;couvercle vert.

- **Contrôle négatif d'IgG HSV-1 ***:** 1 bouteille contenant 2 ml ; coloré jaune ; prêt à utiliser ; couvercle bleu.
- * contient 0.1 % de Bronidox L après dilution
- ** contient 0.2 % de Bronidox L
- *** contient 0.1 % de Kathon

4.2. Matériaux fournis

- 1 support de bande
- 1 couverture autocollante
- 1 protocole d'essai
- 1 plan de distribution et d'identification

4.3. Matériaux et équipement requis

- lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA, équipé pour le mesurage de l'absorbance à 450/620nm
- Incubateur 37°C
- Équipement manuel ou automatique pour rincer les puits
- Pipettes pour usage entre 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau désionisée ou (fraîchement) distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITÉ ET STOCKAGE

Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'échéance indiquée sur l'étiquette une fois stockés à 2... 8°C.

6. PRÉPARATION DE RÉACTIF

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient à la température de la pièce (20... 25°C) avant de commencer l'analyse !

6.1. Bandes recouvertes cassables

Les bandes cassables sont recouvertes de protéine recombinante gG1 et sont prêt à utiliser. Conserver à 2... 8°C. *Après avoir détaché des bandes, les bandes restantes devraient tout de suite être refermées dans le sachet d'aluminium avec le desiccant fourni et être conservées à 2... 8°C; stable jusqu'à la date d'échéance. Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.2. Conjugué anti-IgG HSV-1

La bouteille contient 20ml d'une solution avec de la peroxydase de raifort anti-humaine-IgG, l'amortisseur, les stabilisateurs, les préservatifs et un colorant bleue inerte. La solution est prêt à utiliser. Conserver à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.3. Contrôles

Les bouteilles marquées avec contrôle positif, contrôle cut-off et contrôle négatif contiennent une solution de contrôle prêt à utiliser. Elle contient 0.1% Kathon et doit être stockée à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2...8°C.*

6.4. Diluant de l'échantillon IgG

La bouteille contient 100ml d'un amortisseur de phosphate, des stabilisateurs, des préservatifs et un colorant jaune inerte. Elle est employée pour la dilution de l'échantillon du patient. Cette solution prêt à utiliser doit être stocké à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.5. Solution de lavage (20x conc.)

Le flacon contient 50 ml d'un tampon concentré, des détergents, des stabilisants et des conservateurs. Diluer la solution de lavage au 1/20^{ème} ; par exemple 10 ml de la solution de lavage + 190 ml d'eau bidistillée récente et non contaminée. *Le tampon dilué est stable pendant cinq jours si conservé à +2...+8°C. Le tampon concentré reste stable jusqu'à la date de péremption s'il est conservé à +2...+8°C. Les cristaux dans la solution disparaissent en chauffant à 37°C dans un bain marie.*

6.6. Solution de substrat de TMB

La bouteille contient 15ml d'un système de peroxyde de tetramethylbenzidine/hydrogen. Le réactif est prêt à utiliser et doit être stocké à 2... 8°C, loin de la lumière. *La solution devrait être sans couleur ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat se transforme en bleu, il a pu être contaminé et devrait être remplacé. Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.7. Solution d'arrêt

La bouteille contient 15ml d'une solution acide sulfurique de 0.2 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prêt à utiliser et doit être stocké à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

7. COLLECTION ET PRÉPARATION DES SPÉCIMENS

Utilisez des échantillons de sérum humain ou plasma (citrate) pour cette analyse. Si l'analyse est exécutée dans un délai de 5 jours après la collection de l'échantillon, le spécimen devrait être maintenu à 2... 8°C ; autrement ils devraient être aliquotés et conservés surgelés (-20 à -70°C). Si les échantillons sont conservés congelés, mélangez les échantillons décongelés bien avant l'analyse. *Évitez congélation et décongélation répétée.*

L' inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7.1. Dilution de l'échantillon

Avant l'analyse, tous les échantillons devraient être dilués 1+100 avec le diluant de l'échantillon IgG.

Diluer 10µl de l'échantillon avec 1ml du diluant de l'échantillon IgG dans des tubes pour obtenir une dilution 1+100 et mélanger celle-ci soigneusement par un Vortex.

8. PROCÉDÉ D'ANALYSE

8.1. Préparation d'analyse

Lire attentivement la notice d'emploi **avant** de réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. La technique de dosage suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le dosage doit être effectué sur un automate, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume de la solution de lavage de 300 à 350 µl. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur la feuille fournie dans la trousse, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des étalons. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Veillez assigner au moins :

1 puits	(par exemple A1)	pour le blanc substrat,
1 puits	(par exemple B1)	pour le contrôle négatif
2 puits	(par exemple C1+D1)	pour le contrôle cut-off et
1 puits	(par exemple E1)	pour le contrôle positif.

C'est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient deux fois, si nécessaire.

Exécutez toutes les étapes de l'analyse dans l'ordre donné et sans délai entre les étapes.

Une pointe de pipette propre et jetable devrait être employée pour aliquoter chaque contrôle et échantillon.

Ajuster l'incubateur à 37° ± 1°C.

1. Pipettez 100µl de contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Gardez le puits A1 pour le substrat blanc.
2. Couvrez les puits de couvertures autocollantes.
3. **Incuber pour 1 heure ± 5 minutes à 37±1°C.**
4. Quand l'incubation a été accomplie, enlevez la couverture, aspirez le contenu des puits et lavez chaque puits trois fois avec 300µl de solution de lavage. Évitez les débordements des puits de réaction. Le temps de trempage entre chaque cycle de lavage devrait être > 5sec. À la fin, enlevez soigneusement le fluide restant en tapant les bandes sur des papiers en tissu avant la prochaine étape !
Note : Le lavage est décisif ! Un lavage insuffisant peut mener à une précision faible et à des valeurs d'absorbance faussement élevées.
5. Pipettez 100µl du conjugué anti-IgG HSV-1 dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermez avec la couverture autocollante.
6. **Incuber pendant 30 minutes à la température de la pièce.** *Ne pas exposer à la lumière du soleil directe.*
7. Répétez l'étape numéro 4.
8. Pipetter 100µl de la solution de substrat de TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à la température de la pièce dans l'obscurité.**
10. Pipetter 100µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat de TMB. *N'importe quelle couleur bleue développée pendant l'incubation se transforme en jaune.*
Note : Des échantillons de patients fortement positifs peuvent causer des précipités foncés du chromogène ! Ces précipités peuvent influencer les valeurs mesurées de la densité optique. Il est recommandé de diluer l'échantillon avec la solution physiologique de chlorure de sodium, par exemple 1+1. Ensuite diluer l'échantillon 1+100 avec l'amortisseur et multiplier les résultats en NTU (NovaTec units) par 2.
11. Mesurer l'absorption du spécimen à 450/620nm dans un délai de 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

8.2. Mesurage

Ajuster le lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA à **zéro** en utilisant le **substrat blanc dans le puits A1**.

Si - pour raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le substrat blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorption du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorption mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorption de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorption pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Une lecture bichromatique de longueur d'onde employant 620 nm comme longueur d'onde de référence est recommandée.

En cas de plusieurs mesurages, calculer les **valeurs moyennes d'absorption** de tous les résultats.

9. RÉSULTATS

9.1. Critères De Validité

Afin qu'une analyse soit considérée valide, les critères suivants doivent être respectés :

- **Blanc Substrat** dans A1 : Valeur d'absorbance < **0,100**.
- **Contrôle négatif** dans B1 : Valeur d'absorbance < **0,200 et < cut-off**
- **Contrôle seuil (cut-off)** dans C1 et D1: Valeur d'absorbance **0,150 – 1,30**
- **Contrôle positif** dans E1 : Valeur d'absorbance **>contrôle seuil (cut-off)**.

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

9.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du contrôle seuil (cut-off).

Exemple : $0,37 \text{ DO cont. seuil} + 0,39 \text{ DO cont. seuil} = 0,76 \div 2 = 0,38$

« Cut-off » = 0,38

9.3. Interprétation des résultats

Des échantillons sont considérés **POSITIFS** si la valeur d'absorption est plus élevée que 10% au-dessus du « cut-off ».

Des échantillons avec une valeur d'absorption de 10% au-dessus ou au-dessous du « cut-off » ne devraient pas être considérés comme clairement positifs ou négatifs

→ **zone grise**

Il est recommandé de répéter l'analyse après 2 - 4 semaines avec un échantillon frais. Si les résultats de la deuxième analyse sont encore dans la zone grise l'échantillon doit être considéré **NÉGATIF**.

Des échantillons sont considérés **NÉGATIFS** si la valeur d'absorption est inférieure à 10% au-dessous du « cut-off ».

9.3.1. Résultats en unités NovaTec

Valeur (moyenne) d'absorption du patient x 10 = [unités NovaTec = NovaTec units= NTU]
« cut-off »

Exemple : $\frac{1,786 \times 10}{0,38} = 47 \text{ NTU}$

« Cut-off » :	10	NTU
Zone grise :	9-11	NTU
Négatif :	< 9	NTU
Positif :	> 11	NTU

10. CARACTÉRISTIQUES D'EXÉCUTION

10.1. Précision

<u>Inter-analyse</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>cv (%)</u>
Sérum pos.	12	12.3	2.7
	12	42.5	4.9
<u>Intra-analyse</u>	<u>n</u>	<u>moyenne</u>	<u>cv (%)</u>
Sérum pos.	20	0.45	3.4
	24	1.88	3.7

10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est supérieure à >95%.

10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est supérieure à >95%.

10.4. Interférence

Aucune interférence n' a été observée sur des sérums hémolytiques, lipémiques ou ictériques pour des concentrations allant jusqu' à 10 mg/ml d' hémoglobine, 5 mg/ml de triglycérides et 0.2 mg/ml de bilirubine.

Ces résultats s' appuient sur les groupes d' échantillons étudiés ; il n' agit pas de caractéristiques techniques garanties.

11. LIMITATIONS DU PROCÉDÉ

Une contamination bactérienne ou des cycles gel-dégel répétés du spécimen peuvent affecter les valeurs d'absorption. Le diagnostic d' une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d' une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l' histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques.

Les données sérologiques sont de valeur limité dans le cas des patients immunocompromis et des nouveaux-nés.

12. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l' article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l' utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l' information, les précautions et mises en garde de la notice d' emploi, doivent être suivies de façon stricte. L' utilisation de ces trousses avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l' utilisation avec d' autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l' utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n' est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n' est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les composants d' origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d' autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l' étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l' évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le NovaLisa ELISA est uniquement destiné à l' utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

AVERTISSEMENT : Dans la concentration utilisée, Bronidox L ne pose pratiquement aucun risque toxicologique lors du contact avec la peau et les membranes muqueuses !

AVERTISSEMENT : L' acide sulfurique irrite les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. Lors du contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l' eau et consulter un médecin !

12.1. Mesures d' élimination

Les résidus de réactifs et des préparations sont considérés comme de déchets potentiellement dangereux. L' élimination de ces déchets est soumise à des réglementations nationales et locales. Contacter les autorités locales ou les sociétés spécialisées pour obtenir des conseils sur l' élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION DE COMMANDES

Numéro de Produit : HSV1G0500 HSV-1 IgG-ELISA (96 déterminations)