

ImmunoDOT™ Typage du Virus Herpès Simplex IgG

REF GB 7125



Détection des anticorps d'isotype IgG ou IgM anti-HSV et anti-glycoprotéine G (gG) de type 1 ou type 2

DÉFINITION

Le test **ImmunoDOT™ HSV IgG** destiné au typage du virus Herpès Simplex (HSV) est réalisé selon une technique d'immunoessai (EIA) en phase solide et permet la détection des anticorps d'isotype IgG anti-HSV ou anti-glycoprotéine G (gG). Le test permet de déterminer la présence ou l'absence d'une infection passée au virus de l'Herpès Simplex (HSV) de type 1 et de type 2.

RÉSUMÉ ET EXPLICATIONS

Il existe deux types d'antigènes dans la famille des Herpès. «Le diagnostic définitif des infections génitales due au virus de l'Herpès est fondamental pour la gestion des patients contaminés et pour prévenir la transmission du virus aux partenaires et aux nouveaux-nés». Un tel diagnostic est pourtant imprécis s'il est basé uniquement sur des impressions et le passé clinique. Pour des patients présentant des lésions, la détection et la classification des virus, des antigènes ou des acides nucléiques peuvent être réalisées. Par contre, lorsque les lésions sont absentes, les tests sérologiques d'identification des types de virus sont plus appropriés.

Pour typer spécifiquement le virus HSV, certains Western Blot, ou détermination des protéines spécifiques par biologie moléculaire sont employés. Les coffrets sérologiques de détection précoce destinés au typage du virus HSV, utilisant généralement des lysats de virus entiers, ne permettent pas l'obtention de résultats performants. La protéine, la plus spécifique, est la glycoprotéine G. Le test **ImmunoDOT™ HSV IgG** a été développé à partir des glycoprotéines G recombinantes de type 1 et 2.

PRINCIPE DU TEST

Le test **ImmunoDOT™ HSV IgG** repose sur une technique immunoenzymatique (EIA) sur support membranaire permettant la détection des anticorps dirigés contre les composants de lysat des virus HSV-1 ou HSV-2 et contre les glycoprotéines G spécifiques HSV-1 ou HSV-2.

La bandelette est incubée avec le sérum de patient dilué, afin de permettre aux anticorps réactifs de se fixer aux antigènes coâtés sur la membrane.

Après incubation, une étape de lavage permet d'éliminer les éléments non fixés.

Ensuite, un anticorps secondaire anti-immunoglobulines humaines couplé à la phosphatase alcaline est rajouté et réagit avec les anticorps précédemment capturés.

Après un second lavage, la bandelette est incubée dans un substrat chromogénique. Il permet l'apparition d'un précipité insoluble sous la forme d'un cercle coloré à l'endroit où l'enzyme a été fixée.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Réservé au Diagnostic *In Vitro*.

Les réactifs du Test **ImmunoDOT™ HSV IgG** ont été choisis de façon à former un système optimal. Ne pas les remplacer par d'autres réactifs ou d'autres systèmes d'analyse **ImmunoDOT**.

La dilution ou la modification de ces réactifs peut également modifier les performances du test.

Ne pas utiliser le coffret en cas de contamination microbienne évidente ni après la date de péremption indiquée sur l'emballage.

Utiliser de l'eau distillée ou déionisée en bouteille comme clarifiant.

Il faut observer strictement les procédures du test pour obtenir des résultats optimaux. Ne pas raccourcir ni prolonger les temps d'incubation indiqués, au risque d'obtenir de mauvais résultats.

Certains composants du coffret contiennent de l'azide de sodium, qui peut réagir dans les canalisations de plomb et de cuivre pour former des azides de métal très explosifs. Lors de l'élimination de ces composants, rincer avec un grand volume d'eau pour empêcher l'accumulation de l'azide.

Les produits d'origine humaine ont subi un dépistage négatif, concernant les anticorps anti-VIH 1 et 2, HTLV-1, les anticorps anti-VHC et l'antigène Hbs. Toutefois, s'agissant de produits potentiellement infectieux, il est nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.

CONDITIONS DE CONSERVATION

- Conserver les réactifs et les bandelettes entre +2°C et +8°C.
- Les réactifs doivent être ramenés à température ambiante (entre +15°C et + 30°C) avant utilisation. Ils doivent être utilisés dans l'heure qui suit leur mise en place dans la station de travail chauffée.
- Eviter la contamination des réactifs, qui peut produire des résultats erronés.

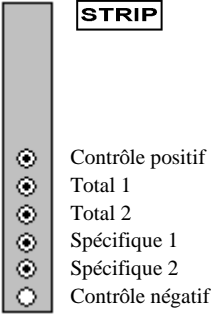
ÉCHANTILLONS

- Le test **ImmunoDOT™ HSV IgG** nécessite 50µl de sérum.
- Éviter d'utiliser des sérums lipémiques ou hémolysés car ils ne sont pas compatibles avec la technique.
- Conserver les échantillons à température ambiante pendant 8 heures maximum. Après ce délai, conserver les échantillons entre +2°C et +8°C.
- Si le dosage est prévu dans un délai plus long, conserver les prélèvements à -20°C.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Station de travail (incubateur)
- Système de prélèvement d'échantillons
- Chronomètre
- Eau distillée ou déionisée pour analyses, utilisée comme clarifiant
- Pipettes
- Papier absorbant pour essuyer les bandes de test

COMPOSITION DU COFFRET

<p>Bandelettes ImmunoDOT™ HSV IgG</p> 	25
<p><i>Ordre des antigènes coatés en commençant par le puits placé en dessous de l'étiquette: Contrôle positif (sérum humain), Total 1 (lysate de virus HSV-1 et glycoprotéine G de type 1), Total 2 (lysate de virus HSV-2 et glycoprotéine G de type 2), Spécifique 1 (glycoprotéine G de type 1), Spécifique 2 (glycoprotéine G de type 2) et Contrôle négatif.</i></p>	
<p>Diluant DIL SPE</p> <p><i>Tampon de dilution contenant des protéines de stabilisation et moins de 0.1% d'azide de sodium.</i></p>	1 x 50ml
<p>Activateur SOLN ENH</p> <p><i>Solution saline contenant du chlorure de sodium et moins de 0.1% d'azide de sodium.</i></p>	1 x 50ml
<p>Conjugué CONJ IgG</p> <p><i>Anticorps de chèvre anti-IgG humaine (chaîne gamma spécifique) conjugué à la phosphatase alcaline dans un tampon de dilution contenant des protéines de stabilisation.</i></p>	1 x 50ml
<p>Révélateur [substrat] SUBS BCIP-NBT</p> <p><i>Tampon substrat contenant du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, du chlorure de p-nitro tetrazolium bleu et moins de 0.1 % de NaN₃.</i></p>	1 x 50ml
<p>Contrôle positif HSV-1 CONTROL +</p> <p><i>Sérum humain contenant des immunoglobulines de type IgG anti-HSV-1, négatif au virus HSV2, contenant des protéines de stabilisation et moins de 0.1% d'azide de sodium.</i></p>	1 x 300µl
<p>Contrôle positif HSV-2 CONTROL +</p> <p><i>Sérum humain contenant des immunoglobulines de type IgG anti-HSV-2, négatif au virus HSV-1, contenant des protéines de stabilisation et moins de 0.1% d'azide de sodium.</i></p>	1 x 300µl
Cuves de réactions	100
Notice technique	1

PRÉPARATION DU TEST

- Allumer la station de travail et régler la température en fonction des instructions d'utilisation de votre appareil.
- Sortir 4 cuves de réaction et les introduire dans les emplacements appropriés de la station de travail.
Pour la station de travail (grand format) : ajouter de l'eau distillée jusqu'à la ligne de remplissage du réservoir de clarifiant prévu.
Pour la station de travail (petit format) : utiliser un récipient adéquat et suffisamment d'eau distillée pour couvrir toutes les fenêtres de réaction de la membrane.
- Identifier une bandelette pour chaque échantillon.

- Placer :
 - 2 ml de diluant (n° 1) dans la cuve de réaction n° 1
 - 2 ml d'activateur (n° 2) dans la cuve de réaction n° 2
 - 2 ml de conjugué (n° 3) dans la cuve de réaction n° 3
- Laisser incuber 10 minutes.
- Vérifier que la température du bloc chauffant soit conforme aux instructions du manuel d'utilisation propre au modèle de la station de travail.
- Dans le cas de l'utilisation de la station de travail (grand format), insérer l'extrémité de la bandelette dans le support, une bandelette par cannelure, faire attention de ne pas toucher les puits de réaction.
- Immerger la bandelette dans le bain d'eau distillée pendant 30 secondes, juste avant de commencer le protocole opératoire. Éviter la formation de bulles d'air.

MODE OPÉRATOIRE

1. INCUBATION DES SERUMS

- Ajouter 50 µl de sérum dans la cuve 1.
- Plonger la bandelette dans la cuve 1.
- Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.
- Laisser incuber 60 mn.

2. LAVAGE

- Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite durant 10 secondes de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.
- Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant.

3. ACTIVATEUR

- Placer la bandelette dans la cuve 2.
- Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.
- Laisser incuber 5 mn.

4. LAVAGE

- Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite durant 10 secondes de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.
- Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant.

5. CONJUGUE

- Placer la bandelette dans la cuve 3.
- Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.
- Laisser incuber 30 mn.
- Au début de cette incubation, verser 2 ml de réactif 4 dans la cuve N°4.

6. LAVAGE

- Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite durant 10 secondes de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.
- Laisser tremper 5 mn sans agiter.
- Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant.

7. REVELATEUR

- Placer la bandelette dans la cuve 4.
- Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.
- Laisser incuber 5 mn.

8. LAVAGE

- Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite durant 10 secondes de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.

9. SECHAGE

- Éliminer l'eau résiduelle avec un papier absorbant, et laisser sécher pendant 5 min avant d'interpréter le résultat. Les bandelettes doivent être parfaitement sèches avant d'être lues. **Un faux positif peut apparaître si la bandelette n'est pas complètement sèche.**

10. LECTURE DE LA BANDE D'ANALYSE

Positif : Un cercle avec une limite distincte et **FACILEMENT VISIBLE** apparaît au centre de la fenêtre. Le périmètre extérieur de la fenêtre doit être blanc à gris pâle.

Négatif : S'il n'y a pas de cercle ou un cercle difficile à voir, l'analyse doit être considérée comme négative.

Chaque fenêtre doit être lue indépendamment.

Afin de réduire au minimum les variations d'interprétation sur les spots négatifs, il est recommandé durant la validation initiale, de tester une série d'échantillons présumés négatifs et de faire lire les bandelettes par chaque technicien. En cas de problème appeler le service technique de bmd (se reporter au § Interprétation pour le rapport d'essai).

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Le test est réalisé avec des réactifs chauffés à **+44°C/+48°C**. La température de la station de travail doit dépasser la température de test dans la cuve de réaction. La température de la station de travail doit être surveillée pour s'assurer du maintien de la température appropriée.

Le guide NCCLS C24-A doit être consulté pour déterminer les contrôles de qualité appropriés à appliquer. Des contrôles complémentaires peuvent être mis en place en fonction des réglementations spécifiques des états, des organismes officiels et d'accréditation. Il est recommandé de tester un sérum de contrôle à réception du coffret. Si ce contrôle n'est pas conforme, les résultats ne devront pas être reportés et les services techniques de bmd doivent être contactés avant toute nouvelle utilisation.

Le dispositif contient des contrôles internes afin d'assurer à chaque étape des performances du test. Le puits de contrôle positif (puits #1) contient du sérum humain et permet de tester la réactivité des réactifs. Le contrôle positif doit être coloré mais ne doit pas être considéré comme un étalon. La membrane autour des spots et le dernier puits de la bandelette constituent le contrôle négatif et doivent restés blanc (#6). Si le puits de contrôle positif n'a pas réagit et inversement si le puits du contrôle négatif à réagit, les résultats ne doivent pas être interprétés.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Interprétation	Total	Total	Spécifique	Spécifique
	1	2	1	2
Négatif	-	-	-	-
HSV Type 1	+	+	+	-
HSV Type 2	+	+	-	+
HSV Type 1&2	+	+	+	+
HSV Positif de type inconnu	+	+	-	-
Non interprétable	-	-	+	-
Non interprétable	-	-	-	+
Non interprétable	-	-	+	+

- Tous les résultats de ce test ou d'autres sérologies doivent être corrélés en fonction du passé clinique du patient, des données épidémiologiques et des autres informations disponibles.
- Il est possible que certains patients soient positifs envers les antigènes totaux 1 et 2 et négatifs pour les glycoprotéines spécifiques 1 et 2. Ce profil indique soit une infection récente ou bien un défaut d'anticorps spécifique chez le patient. En cas d'infection récente, des méthodes de détection des antigènes ou des acides nucléiques ou encore le western blot sont recommandés. Cependant, il est possible qu'aucun anticorps ne soit présent et que le typage soit impossible.
- Comme pour les autres tests sérologiques, un résultat négatif n'élimine pas la possibilité d'une infection au virus de l'Herpès Simplex.

- Un simple résultat positif indique seulement une exposition passée au virus. D'autres méthodes de diagnostic existent pour mettre en évidence une nouvelle infection : culture virale, détection d'antigène ou d'acide nucléique.
- Il est peu probable que d'autres profils apparaissent. Dans ce cas, le test doit être répété et s'il réapparaît le fabricant doit être contacté.

LIMITES DE LA TECHNIQUE

Les infections présentant des symptômes semblables telles que *Candida albicans*, *Bacteriodes species*, *G. vaginalis*, *Mobiluncus species*, ne sont pas éliminées avec ce test. Il est recommandé de faire leur recherche via des tests appropriés.

RÉSULTATS ATTENDUS

Il a été montré que les anticorps anti-glycoprotéine spécifique se développent typiquement en 6 mois. Apparemment, ils apparaissent plus tardivement et moins rapidement que les autres anticorps dirigés contre des protéines moins spécifiques. Par conséquent, les patients ayant une infection récente au virus de l'Herpès simplex doivent être encore négatifs aux glycoprotéines spécifiques.

84 sérums de donneurs de sang ont été testés sur le test de typage **ImmunoDOT™ HSV IgG**. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau n°1.

Tableau n° 1

Interprétation	Pourcentage
Négatif	15.5%
HSV Type 1	36.9%
HSV Type 2	11.9%
HSV Type 1&2	32.1%
HSV Positive de type inconnu	3.6%

PERFORMANCES DU TEST

84 sérums de donneurs de sang ont été testés sur le test de typage **ImmunoDOT™ HSV**, sur un test ELISA en microplaque pour la détection des anticorps spécifiques anti-glycoprotéines 1 et 2 [coffret A], et sur deux tests ELISA en microplaque pour la détection des anticorps anti-lysate cellulaire du virus HSV (non spécifique) [coffrets B et C].

Détection des anticorps anti-lysate HSV

Les résultats comparatifs entre le coffret **ImmunoDOT™ Total 1 et 2** et les deux coffrets ELISA sur microplaque (B et C) sont présentés dans le tableau n°2. La concordance est de 100% ainsi que la sensibilité et la spécificité relatives.

Tableau 2

Coffrets B et C	ImmunoDOT™	
	Négatif	Positif
Négatif	13	0
Positif	0	71

Détection des anticorps spécifiques Spécifique (Typage sérologique)

Les résultats comparatifs entre le coffret **ImmunoDOT™ spécifique 1 et 2** et le coffret ELISA sur microplaque (A) sont présentés dans le tableau n°3. Un échantillon a été identifié négatif avec les coffrets B et C mais identifié positif HSV Type 2 avec une méthode alternative de détection des anticorps anti-gG. Il est considéré comme faux positif et n'est pas présenté dans le tableau 3. La concordance entre les deux méthodes de détection des anti-gG est de 90% (75/83).

Tableau N° 3

ImmunoDOT™	Coffret A	Nombre
Négatif	Négatif	15 (18%)
Type 1	Type 1	32 (39%)
Type 2	Type 2	9 (11%)
Type 1&2	Type 1&2	22 (27%)
Type 1	Négatif	0
Type 1	Type 2	0
Type 1	Type 1&2	0
Type 2	Négatif	0
Type 2	Type 1	0
Type 2	Type 1&2	2 (2%)
Type 1&2	Négatif	0
Type 1&2	Type 1	2 (2%)
Type 1&2	Type 2	0
Négatif	Type 1	1 (1%)
Négatif	Type 2	0
Négatif	Type 1&2	0

La concordance entre les deux méthodes est de 94% (78/84). Le tableau n°4 présente les caractéristiques des performances par rapport au coffret A

Tableau N° 4

Interprétation	Sensibilité Relative	Spécificité Relative
Négatif	100% (15/15)	100% (15/15)
Type 1	95% (56/59)	100% (15/15)
Type 2	94% (31/33)	100% (15/15)

Précision

Comme tout test s'interprétant visuellement, l'intensité du spot est directement liée à la précision du test. Les spots foncés sont plus fiables alors que les spots plus clairs sont proportionnellement moins fiables (équivoque).

BIBLIOGRAPHIE

Nahmias, A., and W. Dowdle. 1968 Antigenic and biologic differences in herpesvirus hominis. *Prog. Med. Virol.* 10:110-159.

Schnewels, K.E. 1962. Serologische untersuchungen zur typendifferenzierung des herpesvirus hominis. *Z. Immunitaetsforsch.* 124:24.48.

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

Brown, Z. A., J.K. Benedetti, D.H. Watts, S. Selke, S. Berry, R. Ashley, and L. Corey. 1995. A comparison between detailed and simple histories in the diagnosis of genital herpes complicating pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172:1299-1303.

Bernstein, D.I., M.A. Lovett, and Y.J. Bryson. 1984. Serologic analysis of first-episode nonprimary genital herpes simplex virus infection. *Am. J. Med.* 77:1055-1060.

Ho, d.W.T., P.R. Fireld, E. Sjogren-Jansson, S. Jeansson, and A.L. Cunningham. 1992. Indirect ELISA for the detection of HSV-2 specific IgG and IgM antibodies with glycoprotein G (gG-2). *J. Virol. Methods* 36:249-264.

Holmberg, S.D., J.A. Stewart, G. russel, R.H. Byers, F.K. Lee, P.M. O'Malley, and A. J. Nahmias. 1988. Prior herpes simplex virus type 2 infection as a risk factor for HIV infection. *JAMA* 259:1048-1050.

McGeoch, D.J., H.W. Moss, D. McNab, and M.C. Frame. 1987. DNA sequence and genetic content of the HindIII region in the short unique component of herpes simplex virus type 2 genome: identification of the gene encoding glycoprotein G, and evolutionary comparisons. *J. Gen. virol.* 68:19-38.

Rapoport, T.A. 1986. Protein translocation across and integration into membranes. *Crit Rev biochem.* 20:73-137.

INDEX DES SYMBOLES













	Déclaration de conformité CE
	Test rapide
	Dispositif de Diagnostic <i>In Vitro</i>
	Référence Catalogue
	Numéro de Lot
	Date d'expiration
	Nombre de tests
	Consulter les instructions d'utilisation
	Limites de température
	Risque biologique
	Contient de l'azide de sodium
	A reconstituer

SCHÉMA RÉCAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE

<p><i>Préparation :</i> STATION DE TRAVAIL</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Allumer et préparer la station de travail (selon le modèle). La température dans les cuves doit être comprise entre +44°C et +48°C. • Positionner les cuves de réaction dans la station de travail et ajouter l'eau dans la cuve de clarifiant. • Immerger la bandelette dans le bain d'eau distillée pendant 30 secondes. • Distribuer : <ul style="list-style-type: none"> - 2 ml de diluant (1) dans la cuve 1 - 2 ml d'activateur (2) dans la cuve 2 - 2 ml de conjugué (3) dans la cuve 3 • Laisser incuber 10 mn. 	<p>INCUBATION 10 minutes</p>
<p>1. INCUBATION DES SERUMS</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 50 µl de sérum dans la cuve de réaction 1. • Immerger la bandelette dans la cuve de réaction 1. • Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut. • Laisser incuber 60 mn. 	<p>INCUBATION 60 minutes</p>
<p>2. LAVAGE</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane. • Eliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant. 	<p>10 secondes</p>
<p>3. ACTIVATEUR</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Plonger la bandelette dans la cuve de réaction 2. • Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut. • Laisser incuber 5 mn. 	<p>INCUBATION 5 minutes</p>
<p>4. LAVAGE</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane. • Eliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant. 	<p>10 secondes</p>
<p>5. CONJUGUE</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Plonger la bandelette dans la cuve de réaction 3. • Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut. • Laisser incuber 30 mn. • Au début de cette incubation, verser 2 ml de substrat dans la cuve N°4. 	<p>INCUBATION 30 minutes</p>
<p>6. LAVAGE</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane. • Immerger la bandelette dans le clarifiant (eau distillée). Laisser tremper 5 mn. • Eliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant. 	<p>10 secondes puis INCUBATION 5 minutes</p>
<p>7. REVELATEUR</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Plonger la bandelette dans la cuve de réaction 4. • Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut. • Laisser incuber 5 mn. 	<p>INCUBATION 5 minutes</p>
<p>8. LAVAGE</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite de façon à ce que le clarifiant (eau distillée) diffuse parfaitement au travers de la membrane. 	<p>10 secondes</p>
<p>9. SECHAGE</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminer l'eau résiduelle avec un papier absorbant, et <u>laisser sécher avant d'interpréter le résultat.</u> 	<p>5 minutes</p>

BioMedical Diagnostics SA



Siège social

Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tél : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com

ImmunoDOT™ Herpes Simplex Virus Typing IgG



GB 7125



Enzyme immunoassay (EIA) detecting HSV or glycoprotein G (gG) type specific IgG or IgM antibodies.

INTENDED USE

ImmunoDOT™ HSV IgG test is an enzyme immunoassay (EIA) detecting HSV or glycoprotein G (gG) type specific IgG antibodies. The test detects the presence or absence of past HSV exposure and specifically determines whether past infection(s) is due to HSV Type 1, Type 2 or both Type 1 and 2.

SUMMARY AND EXPLANATION

There are two herpes antigenic types (1,2). "Definitive diagnosis of genital herpes infections is fundamental to the management of patients and the development of strategies to prevent transmission to partners and neonates" (3). Such diagnosis has proven inaccurate when based solely on clinical history and impression (4). Instead, virus, antigen or nucleic acid detection and classification is used for patients presenting with lesions or type-specific serological tests may be used when lesions are absent.

For type specific serology, either western blot (5,6,7) or determination of type specific protein by molecular biology (8,9) is used. Acceptable type specific classification is not possible using whole virus lysate, the commonly used antigen of early HSV serology kits. The most commonly used type specific protein is glycoprotein G. ImmunoDOT HSV Typing test uses HSV gG type 1 and type 2 specific proteins.

ASSAY PRINCIPLE

The **ImmunoDOT™ HSV IgG** assay uses an enzyme-linked immunoassay (EIA) dot technique for the detection of antibodies to HSV-1 gG, HSV-1 virus lysate proteins, HSV-2 gG or HSV-2 virus lysate proteins.

An assay strip is incubated with dilute patient serum, allowing patient antibodies reactive with the test antigens to bind to the solid support membrane.

In the second stage, the reaction is enhanced by removal of non-specifically bound materials.

During the third stage, alkaline phosphatase-conjugated antihuman antibodies are allowed to react with bound patient antibodies.

Finally, the strip is transferred to enzyme substrate reagent which reacts with bound alkaline phosphatase to produce an easily seen, distinct dot.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *In Vitro* Diagnostic Use Only.

These reagents have been optimized for use as a system. Do not interchange with other reagents or other ImmunoDOT™ assay system.

Dilution or adulteration of these reagents may also affect the performance of the test.

Do not use kit if evidence of microbial contamination is present. Do not use any kits beyond the stated expiration date.

Analytic quality deionized or distilled water must be used as Clarifier.

Close adherence to the test procedure will assure optimal performance. Do not shorten or lengthen stated incubation times since this may result in poor assay performance.

Some assay components contain sodium azide (NaN₃) that may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide buildup.

Human sera used in the preparation of this product were tested and found non-reactive for hepatitis B surface antigen and for antibodies to HIV-1, HIV-2, HTLV-1, and hepatitis C virus. Because no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, handle reagents and patient samples as if capable of transmitting infectious disease.

STORAGE CONDITIONS

- Store reagents and assay strips between +2°C and +8°C.
- Reagents must be at room temperature (between +15°C and +30°C) before use. They must be used within hour which follows their implementation in the warmed workstation.
- Avoid contamination of reagents as that can give erroneous results.

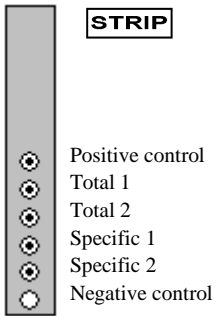
SAMPLE COLLECTION AND HANDLING

- The **ImmunoDOT™ HSV IgG Test** is performed on serum. The test requires 50µL of serum.
- Avoid lipemic or hemolyzed serum specimens has not been shown to be an acceptable specimen.
- Store samples at room temperature for no longer than eight hours. If the assay will not be completed within eight hours, store the sample between +2°C and +8°C.
- If the assay of the samples will not be completed within 48 hours, freeze at -20°C.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Workstation (incubator)
- Specimen collection apparatus
- Timer
- Analytical quality distilled or deionized water to be used for the washes.
- Pipets
- Absorbent toweling to blot dry the assay strip

MATERIAL PROVIDED

ImmunoDOT™ HSV IgG Assay Strips		25
		
<i>Antigens in order beginning with the window next to the label: Positive reagent control (human serum); [Total 1] HSV-1, [Total 2] HSV-2 lysate, [Specific 1] HSV-1 gG, [Specific 2] HSV-2 gG and Negative reagent control.</i>		
Diluent	<input type="checkbox"/> DIL <input type="checkbox"/> SPE	1 x 50mL
Consists of buffered diluent containing protein stabilizers, and <0.1% NaN ₃ .		
Enhancer	<input type="checkbox"/> SOLN <input type="checkbox"/> ENH	1 x 50mL
Consists of sodium chloride and <0.1% NaN ₃ .		
Conjugate	<input type="checkbox"/> CONJ <input type="checkbox"/> IgG	1 x 50mL
Consists of alkaline phosphatase conjugated goat antihuman IgM (heavy chain specific) in buffered diluent, protein stabilizers.		
Developer	<input type="checkbox"/> SUBS <input type="checkbox"/> BCIP-NBT	1 x 50mL
Consists of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and p-nitro blue tetrazolium chloride in buffered diluent and <0.1% NaN ₃ .		
HSV-1 Positive Control	<input type="checkbox"/> CONTROL <input type="checkbox"/> +	1 x 300μL
Consists of HSV-1 IgG positive human serum that is HSV-2 negative containing protein stabilizers and <0.1% NaN ₃ .		
HSV-2 Positive Control	<input type="checkbox"/> CONTROL <input type="checkbox"/> +	1 x 300μL
Consists of HSV-2 IgG positive human serum that is HSV-1 negative containing protein stabilizers and <0.1% NaN ₃ .		
Reaction Vessels		100
Package Insert		1

SETUP

- Turn on Workstation and adjust temperature according to the instructions for use of your instrument.
- Remove 4 Reaction Vessels per test from the product box and insert into appropriate slots in Workstation.
For the large Workstation, add water up to the fill line of the Wash Vessel provided.
For the small Workstation, use an appropriate container and sufficient water to cover all reactive areas/dots of the assay strip.
- Appropriately label the Assay Strips.
- Place:
 - 2 mL Diluent (#1) in Reaction Vessel #1
 - 2 mL Enhancer (#2) in Reaction Vessel #2
 - 2 mL Conjugate (#3) in Reaction Vessel #3

- Incubate for 10 minutes.
- Verify that the temperature of the heating block is in accordance with the instructions of the manual corresponding to the model of the workstation.
- Insert the strip in the distilled water bath (Wash) for 30 seconds, just before starting the assay procedure. Avoid the formation of bubbles on the surface.
- If the large Workstation is used, insert the label end of the assay strip into the Strip Holder, one per groove, taking care not to touch the assay windows.

ASSAY PROCEDURE

1. SAMPLE INCUBATION

- Add 50 μL serum to Reaction Vessel #1.
- Plunge assay strip into Reaction Vessel #1
- Using 10 quick up and down motions with the Assay Strip, mix contents thoroughly.
- Let stand for 60 minutes.**

2. WASH STEP

- Remove Assay Strip from Reaction Vessel and swish in the Wash (distilled water). Use a swift back and forth motion for 10 seconds allowing for optimal washing of the Assay Strip.
- Blot the strip on an absorbent towel.

3. ENHANCER

- Place Assay Strip into Reaction Vessel #2.
- Mix thoroughly with 10 quick up and down motions.
- Let stand for 5 minutes.**

4. WASH STEP

- Remove Assay Strip from Reaction Vessel #2 and swish in the Wash for 10 seconds as described (step #2). The wash should diffuse completely through the strip.
- Blot the strip on an absorbent towel.

5. CONJUGATE

- Place Assay Strip into Reaction Vessel #3.
- Mix thoroughly with 10 quick up and down motions.
- Let stand for 30 minutes.**
- At the beginning of this incubation, place 2mL of reagent #4 into the Reaction Vessel #4.**

6. WASH STEP

- Remove Assay Strip from Reaction Vessel #3 and swish in the Wash as described (step #2) for 10 seconds. The wash should diffuse completely through the strip.
- DO NOT remove the Assay Strip from the wash.
- Allow the Assay Strip to stand in the wash for 5 minutes.**
- Blot the strip on an absorbent towel.

7. DEVELOPER

- Remove Assay Strip from wash and place into Reaction Vessel #4.
- Mix thoroughly with 10 quick up and down motions.
- Let stand for 5 minutes.**

8. WASH STEP

- Remove Assay Strip from Reaction Vessel #4 and swish in the Wash as described (step #2) for 10 seconds. The wash should diffuse completely through the strip.

9. DRY

- Blot and allow Assay Strip to dry. It is imperative that tests of borderline specimens be interpreted after the Assay Strip has been allowed to dry. **A false positive dot may be identified if the assay strip is not dry when interpreted.**

10. READING THE ASSAY STRIP

Positive: A dot with an **EASILY SEEN**, distinct border is visible in the center of the window. The outer perimeter of the window must be white to pale gray.

Negative: If no dot is seen or a dot is difficult to see, interpret it as negative.

Each dot of the assay strip is read independently.

In order to minimize the possibility of "over interpreting" positive test results it is recommended that during initial validation of the assay (as may be required by the laboratory by regulation), the laboratory test a series of presumptive negative samples and each technician interpret the assay strips in a blinded fashion. Please call bmd Technical Service for further clarification (To report results, refer to Interpretation Section).

QUALITY CONTROL

The assay is performed with reagents at **+44°C/+48°C**. The temperature of the Workstation itself should be higher than the assay temperature in the reaction vessel. The Workstation should be monitored to assure the appropriate temperature is maintained.

NCCLS C24-A may be consulted for guidance on appropriate quality control practices. These should be tested according to guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organizations. Unless otherwise required, it is recommended that control sera be tested upon receipt of a kit. If the control is not reactive, results should not be reported and bmd Technical Service should be contacted before the kit is used again.

The kit uses reagent controls to assure performance each time a test is performed. The Positive Control window (well #1) contains human serum and tests reagent reactivity. It must be reactive but the intensity must not be used as a calibrator. As a negative reagent control check, the backgrounds around dots and the bottom window (#6) must be white. If the positive is not reactive or the negative is reactive, do not interpret the assay strip.

INTERPRETATION

Interpretation	Total		Specific	
	1	2	1	2
Negative	-	-	-	-
HSV Type 1	+	+	+	-
HSV Type 2	+	+	-	+
HSV Type 1&2	+	+	+	+
HSV Positive Type Unknown	+	+	-	-
Non Interpretable	-	-	+	-
Non Interpretable	-	-	-	+
Non Interpretable	-	-	+	+

- All results from this and other serologies must be correlated with clinical history, epidemiological data and other data available to the attending physician in evaluating the patient.
- It is expected that some patient samples have both HSV Total 1 and 2 positive and that both Specific 1 and 2 negative. This indicates either a recent infection or that the patient never formed type specific antibody. If a recent infection, isolation, antigen or nucleic acid detection methods are indicated. Otherwise, another method such as western blot may be used. However, it is also possible that no type specific antibody is present and therefore typing is not possible.
- As with other serological tests, negative results do not rule out the diagnosis of herpes simplex disease.

- A single positive result only indicates previous immunologic exposure. Other methods such as nucleic acid, antigen or viral culture are required to establish current infection.
- It is unlikely that patterns other than presented will occur. Repeat the testing and if the pattern repeats, contact the manufacturer.

LIMITATIONS

The performance of this assay has not been established for ruling out diseases with similar symptoms, e.g., *Candida albicans*, *Bacteriodes* species, *G. vaginalis*, *Mobiluncus* species. Instead, also use culture or other appropriate methods.

EXPECTED RESULTS

It has been shown that gG specific antibody typically develops over the course of six months. Appearance is slower and later than antibodies to other, non-type specific proteins. Therefore, it is expected that some patients will be HSV antibody positive yet anti-gG negative.

Eighty-four sera collected from U.S. blood donors were tested using **ImmunoDOT™ HSV IgG** kit. These results are shown in Table 1.

Table 1

Interpretation	Percent
Negative	15.5%
HSV Type 1	36.9%
HSV Type 2	11.9%
HSV Type 1&2	32.1%
HSV Positive Type Unknown	3.6%

PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS OF THE TEST

Eighty-four sera collected from U.S. blood donors were tested using: **ImmunoDOT™ HSV IgG** kit, an alternate commercial microtiter kit for specific detection of either type 1 or type 2 gG antibodies [Kit A], and two alternate commercial microtiter kits for detection of HSV lysate antibodies (Not able to specify type) [Kits B and C].

Total (Traditional Method)

Comparison between **ImmunoDOT™** Total 1 and 2 results and two commercial microtiter kits (Kits B and C) is shown in Table 2. Agreement is 100% and therefore relative sensitivity and specificity are 100%.

Table 2

Alternate Kit	ImmunoDOT™	
	Negative	Positive
Negative	13	0
Positive	0	71

Specific (HSV Serology Type)

ImmunoDOT™ Specific results and the alternate commercial type specific microtiter kit comparison, using the eighty-four blood donor samples, is shown in Table 3. One sample is HSV antibody negative using kits B and C, reported negative by **ImmunoDOT™** but reported HSV Type 2 by the Alternate gG assay. This is considered a false positive and not shown in Table 3. Agreement between the two gG assays is 90% (75/83).

Table 3

ImmunoDOT™	Alternate	Number
Negative	Negative	15 (18%)
Type 1	Type 1	32 (39%)
Type 2	Type 2	9 (11%)
Type 1&2	Type 1&2	22 (27%)
Type 1	Negative	0
Type 1	Type 2	0
Type 1	Type 1&2	0
Type 2	Negative	0
Type 2	Type 1	0
Type 2	Type 1&2	2 (2%)
Type 1&2	Negative	0
Type 1&2	Type 1	2 (2%)
Type 1&2	Type 2	0
Negative	Type 1	1 (1%)
Negative	Type 2	0
Negative	Type 1&2	0

There is 94% (78/84) agreement between the two methods. Assuming alternate test is correct (relative performance) is listed in Table 4.

Table 4

Interpretation	Relative Sensitivity	Relative Specificity
Negative	100% (15/15)	100% (15/15)
Type 1	95% (56/59)	100% (15/15)
Type 2	94% (31/33)	100% (15/15)












Precision

Like any visual interpreted test, dot intensity is directly related to precision. The darkest dots are most reliable while weaker reactions (less intensity) are proportionately less reliable (equivocal or borderline).

REFERENCES

- Nahmias, A., and W. Dowdle. 1968 Antigenic and biologic differences in herpesvirus hominis. *Prog. Med. Virol.* 10:110-159.
- Schnewels, K.E. 1962. Serologische untersuchungen zur typendifferenzierung des herpesvirus hominis. *Z. Immunitaetsforsch.* 124:24.48.
- Ashley, R.L., and A Wald. 1999. Genital herpes: review of the epidemic and potential use of type-specific serology. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(1): 1-8.
- Brown, Z. A., J.K. Benedetti, D.H. Watts, S. Selke, S. Berry, R. Ashley, and L. Corey. 1995. A comparison between detailed and simple histories in the diagnosis of genital herpes complicating pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172:1299-1303.
- Bernstein, D.I., M.A. Lovett, and Y.J. Bryson. 1984. Serologic analysis of first-episode nonprimary genital herpes simplex virus infection. *Am. J. Med.* 77:1055-1060.
- Ho, d.W.T., P.R. Fireld, E. Sjogren-Jansson, S. Jeansson, and A.L. Cunningham. 1992. Indirect ELISA for the detection of HSV-2 specific IgG and IgM antibodies with glycoprotein G (gG-2). *J. Virol. Methods* 36:249-264.
- Holmberg, S.D., J.A. Stewart, G. russel, R.H. Byers, F.K. Lee, P.M. O'Malley, and A. J. Nahmias. 1988. Prior herpes simplex virus type 2 infection as a risk factor for HIV infection. *JAMA* 259:1048-1050.
- McGeoch, D.J., H.W. Moss, D. McNab, and M.C. Frame. 1987. DNA sequence and genetic content of the HindIII region in the short unique component of herpes simplex virus type 2 genome: identification of the gene encoding glycoprotein G, and evolutionary comparisons. *J. Gen. virol.* 68:19-38.
- Rapoport, T.A. 1986. Protein translocation across and integration into membranes. *Crit Rev biochem.* 20:73-137.

SYMBOLS USED

	EC Declaration of conformity
	Rapid test
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Device
	Catalogue number
	Lot Number
	Expiry Date
	Number of test
	Consult Instructions
	Temperature limitation
	Biological risk
	Contains sodium azide

SUMMARY OF METHOD

SETUP	<ul style="list-style-type: none"> • Turn on and prepare the workstation (according to the model). The temperature in vessels must lie within +44°C and +48°C. • Place reaction Vessels into slots in Workstation and add water to the Clarifier Vessel. • Insert the strip in the distilled water bath (Wash) for 30 seconds. • Pipet: <ul style="list-style-type: none"> - 2 mL of diluent (#1) into reaction vessel #1 - 2 mL of enhancer (#2) into reaction vessel #2 - 2 mL of conjugate (#3) into reaction vessel #3 • Incubate for 10 min. 	INCUBATION 10 minutes
1. INCUBATION OF SERA	<ul style="list-style-type: none"> • Add 50 µL of sample sera or positive control to vessel #1. • Immerse strip in reaction vessel #1. • Mix using a swift up and down motion 10 times. • Incubate for 60 min. 	INCUBATION 60 minutes
2. WASH STEP	<ul style="list-style-type: none"> • Wash the strip in the Wash (distilled water) using a swift back and forth motion from left to right so that the water diffuses completely through the membrane. • Blot the assay strip on an absorbent towel. 	10 seconds
3. ENHANCER	<ul style="list-style-type: none"> • Place strip into vessel #2. • Mix using a swift up and down motion 10 times. • Incubate for 5 min. 	INCUBATION 5 minutes
4. WASH STEP	<ul style="list-style-type: none"> • Wash the in the Wash (distilled water) using a swift back and forth motion from left to right so that the water diffuses completely through the membrane. • Blot the assay strip on an absorbent towel. 	10 seconds
5. CONJUGATE	<ul style="list-style-type: none"> • Place strip into vessel #3. • Mix using a swift up and down motion 10 times. • Incubate for 30 min. • At the start of this incubation, place 2 mL of developer into vessel #4. 	INCUBATION 30 minutes
6. WASH STEP	<ul style="list-style-type: none"> • Wash the strip in the Wash (distilled water) using a swift back and forth motion from left to right so that the water diffuses completely through the membrane. • Immerse the strip in the Wash (distilled water). Let stand 5 minutes. • Blot the assay strip on an absorbent towel. 	10 seconds then INCUBATION 5 minutes
7. DEVELOPER	<ul style="list-style-type: none"> • Place strip into vessel #4. • Mix using a swift up and down motion 10 times. • Incubate for 5 min. 	INCUBATION 5 minutes
8. WASH STEP	<ul style="list-style-type: none"> • Wash the strip in the Water (distilled water) using a swift back and forth motion from left to right so that the water diffuses completely through the membrane. 	10 seconds
9. DRY STEP	<ul style="list-style-type: none"> • Remove the residual water with absorbent paper, and let dry before interpreting the result. 	WAIT 5 minutes

BioMédical Diagnostics SA



Office
Actipole 25
4 blvd de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tel : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com