

ImmunoDOT™ Typage du Virus Herpès Simplex IgM

REF GB 8125



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 IgM** 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 IgM anti-HSV ou anti-glycoprotéine G (gG).

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 IgM** a été développé à partir des glycoprotéines G recombinantes de type 1 et 2.

PRINCIPE DU TEST

Le test **ImmunoDOT™ HSV IgM** 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 IgM** 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.

Avertissement – Dangers biologiques :

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.
- Éviter la contamination des réactifs, qui peut produire des résultats erronés.

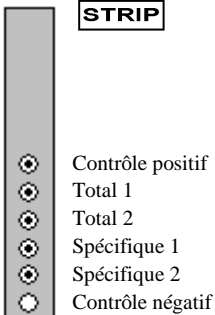
ÉCHANTILLONS

- Le test **ImmunoDOT™ HSV IgM** nécessite 50µl de sérum.
- Eviter 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 bandelettes.

COMPOSITION DU COFFRET

<p>Bandelettes ImmunoDOT™ HSV IgM</p>  <p>25</p>	
<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 <i>Tampon de dilution contenant des anticorps de chèvre anti-IgG humaine, des protéines de stabilisation et moins de 0.1% d'azide de sodium.</i></p>	1 x 50ml
<p>Activateur <i>Solution saline contenant du chlorure de sodium et moins de 0.1% d'azide de sodium.</i></p>	1 x 50ml
<p>Conjugué <i>Anticorps de chèvre anti-IgM 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] <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 <i>Sérum humain contenant des immunoglobulines de type IgM 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 <i>Sérum humain contenant des immunoglobulines de type IgM 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
<p>Cuves de réactions</p>	100
<p>Notice technique</p>	1

PRÉPARATION DU TEST

- Allumer la station de travail et régler la température en fonction de l'instruction 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.

3. ACTIVEUR

- 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.

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 incuber 5 mn.**

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 rapporter 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 les 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 rester blancs (#6). Si le puits de contrôle positif n'a pas réagi et inversement si le puits du contrôle négatif a réagi, les résultats ne doivent pas être interprétés.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Attention :

Le typage des IgM est moins précis que le typage des IgG.

Le résultat des spots « Total » doit être positif pour pouvoir interpréter le spot « Spécifique ». De plus, les IgG doivent être positives pour interpréter un échantillon IgM Positif

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

- La présence d'IgM n'est pas forcément liée à une réactivation de l'infection. Pour cette raison le test IgM n'est pas recommandé comme diagnostic différentiel, mais peut apporter une information à propos d'un patient ayant une réponse d'anticorps particulière.

- La confirmation de l'infection nécessite l'isolation du virus ou des acides nucléiques et une identification.
- Comme pour les autres tests sérologiques, un résultat négatif n'élimine pas la possibilité d'une infection au virus de l'Herpès Simplex.
- 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.

RÉSULTATS ATTENDUS

57 sérums provenant de donneurs de sang ont été testés sur le test de typage **ImmunoDOT™ HSV IgM**. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous

Tableau n° 1

Interprétation	Résultats
Négatif	35 (61%)
HSV Type 1	8 (14%)
HSV Type 2	12 (21%)
HSV Type 1&2	2 (4%)
HSV Positive de type inconnu	0

Afin de valider la spécificité, 80 échantillons pédiatriques ont été testés. Les 80 échantillons ont bien été trouvés négatifs selon les critères d'interprétation. Cependant certains échantillons étaient IgM positifs et IgG négatifs. Ces résultats renforcent la nécessité d'utiliser les résultats IgG pour interpréter un IgM positif.

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 ou limite).

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. Immunitätsforsch.* 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.

SCHÉMA RÉCAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE

Préparation : STATION DE TRAVAIL	<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. 	INCUBATION 10 minutes
1. INCUBATION DES SERUMS	<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. 	INCUBATION 60 minutes
2. LAVAGE	<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. Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant. 	10 secondes
3. ACTIVATEUR	<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. 	INCUBATION 5 minutes
4. LAVAGE	<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. Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant. 	10 secondes
5. CONJUGUE	<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. 	INCUBATION 30 minutes
6. LAVAGE	<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. Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant. 	10 secondes puis INCUBATION 5 minutes
7. REVELATEUR	<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. 	INCUBATION 5 minutes
8. LAVAGE	<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. 	10 secondes
9. SECHAGE	<ul style="list-style-type: none"> Éliminer l'eau résiduelle avec un papier absorbant, et laisser sécher avant d'interpréter le résultat. 	5 minutes

INDEX DES SYMBOLES



Déclaration de conformité CE



Test rapide



Dispositif de Diagnostic *In Vitro*



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

BioMédical Diagnostics SA

Siège social

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



ImmunoDOT™ Herpes Simplex Virus Typing IgG

REF GB 8125



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

INTENDED USE

ImmunoDOT™ HSV Typing IgM test is an enzyme immunoassay (EIA) detecting HSV or glycoprotein G (gG) type specific IgM antibodies.

SUMMARY AND EXPLANATION

There are two herpes antigenic types. "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". Such diagnosis has proven inaccurate when based solely on clinical history and impression. 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 or determination of type specific protein by molecular biology 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 IgM test** uses HSV gG type 1 and type 2 recombinant proteins.

ASSAY PRINCIPLE

The **ImmunoDOT™ HSV IgM** 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.

Warning - Potential Biohazardous Material:

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 50 µL 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 IgM Assay Strips 	25
<i>Antigens in order beginning with the window next to the label: Positive reagent control (human serum); Total 1 (HSV-1 Lysate and HSV-1 gG), Total 2 (HSV-2 and HSV-2 gG), Specific 1 (HSV-1 gG), Specific 2 (HSV-2 gG) and Negative reagent control.</i>	
Diluent Consists of buffered diluent containing IgG absorbent (goat antihuman IgG), protein stabilizers, and <0.1% NaN ₃ .	1 x 50mL
Enhancer Consists of sodium chloride and <0.1% NaN ₃ .	1 x 50mL
Conjugate Consists of alkaline phosphatase conjugated goat antihuman IgM (heavy chain specific) in buffered diluent, protein stabilizers.	1 x 50mL
Developer Consists of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and p-nitro blue tetrazolium chloride in buffered diluent and <0.1% NaN ₃ .	1 x 50mL
HSV-1 Positive Control Consists of HSV-1 IgM positive human serum that is HSV-2 negative containing protein stabilizers and <0.1% NaN ₃ .	1 x 300µL
HSV-2 Positive Control Consists of HSV-2 IgM positive human serum that is HSV-1 negative containing protein stabilizers and <0.1% NaN ₃ .	1 x 300µL
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 window 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

Caution:

IgM typing is less accurate than IgG typing. Total results must be positive to interpret the specific result Also IgG must be positive to interpret a sample as IgM positive.

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

- IgM presence may indicate infection by either serotype or reactivation of a latent HSV (either serotype). For this reason, IgM testing is not recommended as a differential diagnostic, but may offer information about a particular patient's antibody response.

- IgM reactivity DOES NOT necessarily indicate current infection since reactivation may occur.
- Confirmation of infection requires virus isolation or nucleic acid identification.
- As with other serological tests, negative results do not rule out the diagnosis of herpes simplex disease.
- It is unlikely that patterns other than presented will occur. Repeat the testing and if the pattern repeats, contact the manufacturer.

EXPECTED RESULTS

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

Table 1

Interpretation	Result
Negative	35 (61%)
HSV Type 1	8 (14%)
HSV Type 2	12 (21%)
HSV Type 1&2	2 (4%)
HSV Positive Type Unknown	0

To assure specificity, 80 pediatric samples were tested. All 80 samples reported negative using the recommended interpretation criteria; however, several samples did report IgM reactive but were not IgG positive. These data reinforce the need to use the IgG result when interpreting IgM reactivity.

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. Immunitätsforsch.* 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.

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: - 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 an up and down 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 an up and down 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

SYMBOLS USED

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

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

