



Key Code TSMX7845

www.oxoid.com/ifu

Europe +800 135 79 135

US 1 855 2360 190

CA 1 855 805 8539

ROW +31 20 794 7071

IDEIA Herpes Simplex Virus

REF K605711-2

Σ 96

PT

Um imunoenensaio enzimático amplificado para a detecção directa do Vírus Herpes Simplex nas amostras clínicas de doentes sintomáticos.

1. INDICAÇÃO DE USO

O teste IDEIA™ Herpes Simplex Virus (HSV) é um imunoenensaio enzimático amplificado qualitativo para a detecção directa do vírus herpes simplex (HSV) nas amostras clínicas de humanos de pacientes sintomáticos.

2. RESUMO

O HSV é um vírus que contém DNA similar morfológicamente a outros membros do género herpesviridae. Dois tipos distintos antigenicamente são reconhecidos, tipos atribuídos 1 e 2.

Os tipos HSV 1 e 2 estão frequentemente envolvidos nas infecções superficiais da cavidade oral, pele, olho e genitais^{1,2}. As infecções do sistema nervoso central (meningoencephalitis) e generalizadas severas no neonatal e doentes imunocomprometidos são também observadas, embora mais raramente. Logo que a infecção primária for eliminada, o vírus pode existir numa forma latente no tecido nervoso, de onde pode emergir novamente sob certas condições causando uma recorrência dos sintomas.

Actualmente existem dois métodos principais de diagnósticos para a detecção do HSV nas amostras clínicas. Primeiro, por isolamento do vírus viável nas células cultivadas seguido de identificação do agente por meios imunológicos ou por microscopia do electrón;^{1,2} e segundo, por demonstração directa do antígeno do vírus nas amostras clínicas usando um anticorpo monoclonal marcado por fluorescência ou um imunoenensaio enzimático.

O isolamento viral nas monocamadas da cultura celular é trabalhoso, consome tempo e investimento e requer um grau de experiência técnica que talvez não esteja disponível em diversos laboratórios.

O teste IDEIA HSV é considerado um diagnóstico alternativo para a detecção directa do antígeno do herpes nas amostras clínicas. O teste usa anticorpos monoclonais para detectar o antígeno HSV 1 e HSV 2 e um sistema de amplificação enzimática para amplificar o sinal do teste³. O teste enzimático é simples e mais rápido de realizar do que o isolamento viral para a detecção do HSV nas amostras clínicas e culturas celulares.

O teste IDEIA HSV fornece todos os reagentes necessários para detectar o HSV nas amostras clínicas. O teste pode ser feito em menos de duas horas usando a instrumentação e procedimentos convencionais de imunoenensaio enzimático e oferece sensibilidade

geral excelente (93,6%) e especificidade (97,8%) relativas aos métodos de referência da cultura celular.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O teste IDEIA HSV usa anticorpos monoclonais murinos específicos do HSV e um sistema de amplificação enzimático³. O antígeno HSV (comum aos tipos 1 e 2), presente nas amostras clínicas, é ligado pelo anticorpo monoclonal murino absorvido na superfície do micropoço de plástico. O anticorpo monoclonal murino conjugado enzimático liga o antígeno “capturado” e subsequentemente a enzima catalisa a conversão do substrato para o produto. Este produto participa na segunda reacção enzimática, que resulta na alteração da cor. O processo de desenvolvimento da cor é interrompido pela adição do ácido. Uma intensidade da cor significativamente acima dos níveis de fundo é indicativo do antígeno HSV presente nas amostras clínicas (consultar a Secção 9).

Reconhecimentos

Os anticorpos monoclonais foram criados no Departamento de Patologia da Universidade de Cambridge, Cambridge, Grã Bretanha⁴.

4. DEFINIÇÕES

Os símbolos que se seguem foram utilizados em todas as informações sobre o produto.



Código do produto e número de catálogo



Consulte as instruções para uso



Contém o suficiente para os testes <N>



Fabricado por



Aparelho médico de diagnóstico *In vitro*



Utilizar até



Código de lote



Limite de temperatura de armazenagem

5. REAGENTE FORNECIDO

Σ 96 – Cada kit contém materiais para 96 determinações. - O tempo de armazenagem do kit é conforme indicado no rótulo externo da caixa.

5.1. CONTEÚDO DO TESTE IDEIATM HSV



Instruções para livreto de uso.



Uma placa de 96 micropoços com tiras de separação de 12, 8 micropoços cobertos com anticorpo monoclonal murino anti HSV. Uma embalagem de plástico novamente selada é fornecida para armazenagem de micropoços não usados.

é fornecido um frasco com cada um dos seguintes produtos:



Meio de transporte de 100mL: detergente não iónico em um tampão com tinta colorida, agentes antimicrobiano e anti-espuma.



Controlo positivo de 3mL: um tecido homogeneizado de células Hela infectadas com HSV em solução tampão com proteína e detergente.



12mL controlo negativo: solução tampão contendo agente microbiano, tinta colorida e agente anti-espuma.



Conjugado de 7mL: anticorpo monoclonal murino de fosfatase alcalina (fragmento F_{ab}) no tampão de estabilização contendo corante colorido e um agente microbiano.



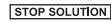
125mL de concentrado de tampão de lavagem (x10): solução tampão tris contendo detergente e um agente antimicrobiano.



13mL amplificador A: sais inorgânicos e solução de enzima tampão contendo violeta tetrazolium e agente antimicrobiano.



13mL amplificador B: solução NADPH estabilizada.



13mL solução de interrupção: 1 mol/L de ácido fosfórico.

5.2. PREPARAÇÃO, ARMAZENAGEM E REUTILIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO KIT

O formato do kit IDEIA HSV permite testar até 12 lotes de amostras. Para assegurar desempenho óptimo do kit, é importante que todos os componentes sem uso do kit sejam armazenados de acordo com suas instruções.

5.2.1 Micropoços revestidos com anticorpo monoclonal - MICROTITRATION PLATE

Abra a embalagem da placa rompendo a vedação. Rompa o número necessário de micropoços e recolha-os no quadro. Coloque os micropoços não usados em saquetas de plástico com fecho auto-adesivo e armazene-os a 2-8°C. Os micropoços podem ser utilizados até 6 semanas após a abertura, dado que sejam armazenados desta forma.

5.2.2 Meio de transporte - TRANSPORT MEDIUM

Pronto para usar. É importante misturar o meio de transporte antes de usar.

Um agente anti-espuma no concentrado do meio de transporte causa um meio de transporte a uma concentração adequada apresentando-se nebuloso sem afectar o teste e improvável que seja devido a contaminação microbiana.

5.2.3 Controlo positivo - CONTROL +/-

Pronto para usar. Armazenar a 2-8°C.

5.2.4 Controlo negativo - CONTROL +/-

Pronto para usar. Armazenar a 2-8°C.

5.2.5 Conjugado - CONJUGATE

Pronto para usar. Armazenar a 2-8°C.

5.2.6 Concentrado de tampão de lavagem - WASH BUFFER (x10)

Fornecido 10x concentrado. Preparar a quantidade de tampão de lavagem necessária, a uma concentração adequada adicionando 1 parte do concentrado a 9 partes de água destilada ou desionizada fresca. É fornecido concentrado suficiente para preparar até 100mL de tampão de lavagem resistente ao trabalho para cada lâmina de 8 micropoços. Preparar a quantidade de tampão de lavagem, conforme requerido no dia da utilização (consulte a secção 8.2.10) Armazenar a 2-8°C.

Não armazenar o tampão de lavagem, a uma concentração adequada para utilização subsequente (secção 8.1.12)

5.2.7 Amplificador A - AMPLIFIER A

Pronto para usar. Armazenar a 2-8°C.

5.2.8 Amplificador B - AMPLIFIER B

Pronto para usar. Armazenar a 2-8°C.

5.2.9 Solução de paragem - STOP SOLUTION

Pronto para usar. Armazenar a 2-8°C.

6. REAGENTES ADICIONAIS

6.1. REAGENTES

Água desionizada ou destilada fresca para a preparação do tampão de lavagem.

6.2. ACESSÓRIOS

Os seguintes produtos são indicados para utilização em conjunto com IDEIA HSV. Contactar sua subsidiária ou distribuidor Oxoid para obter mais informações.

IDEIA HSV Extraction Buffer 10mL (nº de código S601230-2).

IDEIA HSV Blocking Reagents (nº de código S603330-2)

IDEIA PCE/HSV Wash Buffer Concentrate (x10) 125mL (nº de código S603930-2).

IDEIA HSV Transport Medium 100mL (nº de código S605530-2).

7. EQUIPAMENTO

O seguinte equipamento é necessário:

Frascos com tampas de rosca, resistente ao calor (100°C) e limpos
Misturador de vórtice

Papel absorvente limpo (onde os micropoços podem ser secados)

Pipetas de precisão e pontas de eliminação para transportar 50µL, 1,000µL ou pastettes graduados para dispensar amostra de 200µL (opcional)

Recipiente de eliminação de lixo com desinfectante fresco adequado

Incubador 37°C

Lavador automático de placa (opcional) ou equipamento adequado para lavar 8 tiras de micropoço (secção 10.4.4).

Nota: Se lavar menos do que 8 micropoços de teste em uma lâmina usando um lavador automatizado com um 8 cabeçotes de micropoço, é importante completar o preenchimento da lâmina com os micropoços em branco.

O espectrofotômetro ou leitor de placa EIA é capaz de ler uma placa micropoço 96 de 8 lâminas de micropoço com uma absorção de 490nm com referência em 620-650nm. (Opcional, consultar a secção 10.5, Ler os resultados dos testes).

8. PRECAUÇÕES

IVD - Para uso em diagnóstico *in vitro*. Qualquer pessoa fazendo um ensaio com este produto deve ser treinado no seu uso e ter experiência em procedimentos de laboratórios.

8.1. PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

8.1.1 Os seguintes reagentes contêm azida sódica (15mmol/L) substância considerada venenosa; meio de transporte, conjugado controlos negativo e positivo, concentrado de tampão de lavagem, e reagente do amplificador A. A azida sódica pode reagir com os sistemas de tubagem de cobre e chumbo para formar as azidas metálicas explosivas. Elimine sempre os materiais que contêm azida lavando com grande quantidades de água.

8.1.2 A solução de interrupção contém 1mol/L de ácido fosfórico. Evite contacto com o olho e pelo usando uma roupa de protecção ou proteja o olho.

8.1.3 O controlo positivo contém o antígeno HSV inactivo considerado não infeccioso. Portanto, o controlo deve ser manipulador e eliminado como se fosse material potencialmente infeccioso. O controlo positivo contém também um detergente (1%v/v). É necessário evitar o contacto com a pele.

8.1.4 Não come, beba, fume, armazene ou prepare os alimentos ou aplique cosméticos dentro da área de trabalho designada.

8.1.5 Não use materiais de pipeta pela boca.

8.1.6 Use luvas descartáveis ao manipular amostras clínicas e lave sempre as mãos depois de usar os materiais potencialmente infecciosos.

8.1.7 Elimine todas as amostras clínicas e reagentes de acordo com a legislação local.

8.1.8 Planilha de dados de segurança disponíveis para usuários profissionais sob solicitação.

8.2. PRECAUÇÕES TÉCNICAS

8.2.1 Os componentes não devem ser usados após a data de validade impressa nos rótulos. Não misture ou troque os lotes/conjuntos diferentes de reagentes.

8.2.2 Os reagentes são fornecidos em concentrações de funcionamento fixas. O desempenho do teste será afetado adversamente se os reagentes forem alterados ou armazenados sob condições outras que não estas detalhadas na secção 5.2.

8.2.3 Evite a contaminação de reagentes.

8.2.4 Ao usar o método do frasco conta-gotas certifique-se de que todos os controlos e reagentes são adicionados da mesma forma. (O desempenho do kit pode ser adversamente afectado se uma combinação de pipeta e métodos de conta gota forem usados).

8.2.5 Evite multiplicar as amostras dos reagentes de amplificação. Transfira a quantidade necessária em um recipiente limpo adequado. Não devolva o excesso de reagente no vidro de conta gota.

8.2.6 Use as pipetas de eliminação separadas ou pontas de pipeta para cada amostra, controlo ou reagente (se não estiver usando os vidros de conta gota) para evitar a contaminação cruzada de ambos as amostras, controlos ou reagentes que poderiam gerar resultados errados.

8.2.7 Armazenar água destilada ou desionizada para diluir os reagentes concentrados em recipientes limpos para evitar a contaminação microbiana.

8.2.8 Certifique-se de que não ocorra nenhuma contaminação cruzada entre os micropoços em todos os estágios do teste. É essencial que o conjugado de polímero não permita a contaminação de outros reagentes ou equipamento. Se o método de conta gota não for usado reserve então uma pipeta separada para dispensar o conjugado e uma pipeta separada para dispensar os reagentes de amplificação. Evite tocar ou derramar o bordo do conjugado com micropoço. O conjugado permitido a secar na borda do micropoço pode adversamente afectar o desempenho do teste.

8.2.9 Os micropoços não podem ser reusados.

8.2.10 Não armazene o tampão de lavagem de resistência para uso subsequente. Quando não estiver em uso a lavagem dos recipientes de tampão devem ser lavadas com água destilada ou desionizada e deixadas a secarem.

8.2.11 O sistema de amplificação da enzima é um detector altamente sensível de moléculas de fosfatase de alcalina. **É muito importante que o conjugado não ligado seja removido através da lavagem de micropoços antes de adicionar os reagentes de amplificação.** Lavagem cuidadosa de micropoços seja feita usando as técnicas detalhadas na secção 10.4.4. A lavagem ineficiente pode levar a resultados incorrectos.

8.2.12 O equipamento de lavagem automatizada ou manual deve estar livre de contaminação microbiana, ser correctamente calibrado e mantido de acordo com as instruções do fabricante.

8.2.13 Não deve ser utilizada a salina tamponada com fosfato (PBS) e outras soluções de lavagem contendo fosfato com o ensaio para evitar a inibição do enzima conjugado que pode afectar o desempenho do teste. O equipamento de lavagem usado com soluções de lavagem com base fosfática deve ser cuidadosamente enxaguado com água destilada ou desionizada antes do escorvamento com o IDEIA PCE/HSV Wash Buffer Concentrate (nº de código S603930-2).

9. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras recolhidas da seguinte forma podem ser testadas no kit da IDEIA HSV:

Amostras recolhidas no meio de transporte IDEIA HSV (consultar a secção 9.3.1)

Amostras recolhidas no meio de transporte para isolamento viral nas monocamadas da cultura celular (consultar a secção 9.3.2).

9.1. MEIO DE TRANSPORTE

Se o meio de transporte IDEIA HSV for usado para a recolha de amostra, dispensar 1mL de alíquota do meio de transporte da amostra em frascos limpos com tampa de rosca. As alíquotas de 1mL podem ser armazenadas a 2-8°C por 12 meses ou de acordo com a data de validade no rótulo do frasco. Armazenar em temperatura ambiente (15-30°C) por 6 meses.

Nota: É importante processar num vórtice ou misturar o meio de transporte totalmente antes de dispensá-lo ou usá-lo. O meio de transporte contém um agente anti-espuma que faz com que o meio pareça turvo. Isto não afecta o teste e não é gerado pela contaminação microbiana do meio de transporte. O meio de transporte contém um detergente forte que torna as amostras inadequadas para a cultura celular.

9.2. RECOLHA DA AMOSTRA

Uma boa técnica de amostra é essencial para a detecção ideal do HSV nas amostras clínicas. As amostras de uma lesão clínica devem ser recolhidas por indivíduos qualificados usando uma zaragatoa esterilizada. As amostras devem ser recolhidas para conter tanto material infectado quanto for possível. São recomendadas as zaragatoas esterilizadas de algodão, ou com a ponta em Dacron®, com hastes de papel comprimidas.

Cremes, óleos, loções, gelo, álcool, solução de betadina, zinco ou um banho de assento reduzem significativamente o rendimento viral⁸. O uso destes remédios deve ser evitado, se possível, antes da recolha das amostras ou deve ser relatado ao médico quando for feita a amostra da lesão.

9.2.1 Amostras clínicas

As úlceras devem ser firmemente esfregadas com a zaragatoa para recolher as células infectadas e exsudá-las da suas bases. As vesículas devem ser cuidadosamente abertas, o fluido recolhido

na zaragatoa e a base da lesão esfregada com a zaragatoa. Colocar a zaragatoa num frasco com tampa de rosca com meio de transporte relevante. Lesões pustulosas devem ser tratadas da mesma forma que as vesículas, as crostas devem ser adicionadas para o meio de transporte num frasco com tampa de rosca ou enviadas a seco. As amostras podem ser armazenadas a 2-8°C por não mais do que 3 dias.

Amostras rectal ou ano-rectal se contaminadas por material fecal podem conduzir a resultados falsos positivos. Estes podem ser confirmados usando os Reagentes de Bloqueio HSV IDEIA (nº de código S603330-2).

9.2.2 Amostras cervicais em doentes sintomáticos

Esfregar a zaragatoa em quaisquer lesões visíveis, caso contrário esfregar a zaragatoa no colo uterino. Retirar a zaragatoa sem tocar a superfície da vagina e colocá-la num frasco com tampa de rosca com meio de transporte relevante. As amostras podem ser armazenadas a 2-8°C por não mais do que 3 dias.

9.3. PROCESSAR AS AMOSTRAS

9.3.1 Transporte de zaragatoas no Meio de Transporte IDEIA HSV

Colocar as amostras no vórtice antes de testá-las e continuar para a secção 10.2.

9.3.2 Transporte das zaragatoas no Meio de Transporte para o Isolamento Viral

O IDEIA Tampão de Extração HSV (nº de código S601230-2) é necessário para processar as zaragatoas recolhidas no meio de transporte do laboratório para isolamento viral. As amostras devem apenas ser processadas para testar o IDEIA HSV após a inoculação das monocamadas da cultura celular, uma vez que, o tratamento com tampão de extração concentrado torna a amostra inadequada para o isolamento viral.

Adicionar 100µL de tampão de extração (nº de código S601230-2) para 900µL do meio de transporte viral. Processar as amostras de acordo com o procedimento definido na secção 10.2.

Não usar o meio de transporte fornecido no kit para processar as zaragatoas no meio de transporte viral, uma vez que isto não proporcionará a extração ideal do antígeno HSV da zaragatoa.

10. PROCEDIMENTO DE TESTE

CONSULTAR A SECÇÃO “8.2 PRECAUÇÕES TÉCNICAS” ANTES DE EFECTUAR O PROCEDIMENTO DE TESTE.

10.1. PREPARAÇÕES DOS CONTROLOS

Controlo negativo

Misturar o controlo negativo no vórtice durante um **mínimo de 15 segundos**. Adicionar o reagente directamente aos micropoços apropriados.

Controlo positivo

Misturar o controlo positivo no vórtice durante **1 minuto**. Adicionar o reagente directamente ao micropoço apropriado. Se necessário, pode ser testado um controlo adicional com um nível inferior de reactividade, para monitorizar o desempenho do kit.

10.2. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS E CONTROLOS

Misturar no vórtice todas as amostras e controlos processados (consultar a secção 9.3) durante 15 segundos antes de os adicionar aos micropoços.

10.3. ARMAZENAGEM DE AMOSTRAS TRATADAS

As amostras podem ser armazenadas a -20°C até 4 semanas após o processamento. Se testar as amostras congeladas, permita que estas descongelem à temperatura ambiente (15-30°C) e

depois misture-as vigorosamente durante cerca de 1 minuto imediatamente antes do teste.

10.4. PROCEDIMENTO DE TESTE

Recomenda-se que os métodos consistentes para adições de reagentes aos micropoços sejam utilizados através do procedimento de teste, ex. pontas de pipetas, frascos conta-gotas ou sondas automatizadas. Para lotes pequenos de testes a utilização de frascos conta-gotas com reagente evita a entrada múltipla de pontas de pipeta nos frascos dos reagentes.

10.4.1 Amostra e adição de controlo

Colocar o número necessário de micropoços no suporte. Adicionar 600µL de amostras aos micropoços apropriados. Adicionar 6 gotas (ou 200µL) de controlos negativo e positivo para separar os micropoços. (Pelo menos três micropoços de controlo negativo e um de controlo positivo devem ser incluídos em cada lote de amostras testadas).

10.4.2 Adição de conjugado

Após a adição de todas as amostras e controlos adicionar 1 gota (ou 50µL) do conjugado em cada micropoço. **Evitar mergulhar a pipeta ou ponta do frasco conta-gota nos micropoços ao dispensar o conjugado, uma vez que pode causar contaminação cruzada entre os micropoços. Além disso, evitar tocar os topos ou as bordas dos micropoços com o conjugado, uma vez que pode afectar negativamente o funcionamento do teste.**

10.4.3 Primeira incubação

Colocar uma tampa em cima das placas e incubar os micropoços a **35-37°C** numa **caixa húmida** durante **90 minutos**.

10.4.4 Lavar os micropoços

Os micropoços devem ser lavados usando um tampão de lavagem à concentração adequada e preparados fresco (secção 5.2.6).

A técnica de lavagem é crucial para o desempenho do teste (secção 8.2.10) e deve ser realizada para assegurar o preenchimento completo (com um mínimo de **350µL** de tampão de lavagem à concentração adequada) e esvaziamento os micropoços.

São essenciais quatro ciclos de lavagem, quer através de técnicas de lavagem manual ou automatizada, que devem incluir um período de 2 minutos de imersão durante a segunda lavagem, ou uma imersão total de 2 minutos durante o ciclo completo.

Lavagem manual

Se lavar os micropoços manualmente, aspire ou sacuda os seus conteúdos e use tampão de lavagem fresco para assegurar o preenchimento e esvaziamento completo dos poços. Nos intervalos entre as etapas de lavagem, remover completamente o tampão de lavagem excedente invertendo os micropoços sobre o papel absorvente limpo, dando-lhes leves pancadas. A eficácia da lavagem manual é ainda mais acentuada se o tampão de lavagem for aplicado num ângulo de tal forma que produza um vórtice nos micropoços. Depois da lavagem final, a placa deve ser invertida sobre o papel absorvente para remover os últimos vestígios do tampão de lavagem, dando-lhe leves pancadas.

Lavagem automatizada

Os lavadores automáticos devem ser programados para completar 4 ciclos de lavagem incorporando o equivalente a 2 minutos de imersão durante o ciclo completo. Os lavadores devem ser correctamente calibrados para assegurar o preenchimento e esvaziamento completo dos micropoços entre cada lavagem. Depois de terminar a lavagem, a placa deve ser invertida sobre o papel absorvente para remover os últimos vestígios do tampão de lavagem, dando-lhe leves pancadas.

10.4.5 Adição de amplificador

Adicionar 2 gotas (ou 100µL) de amplificador A para cada micropoço.

Adicionar 2 gotas (ou 100µL) de amplificador B para cada micropoço.

Evitar tocar os micropoços com as pontas do conta-gota ou da pipeta ao dispensar o amplificador A e B, uma vez que isto pode levar a contaminação cruzada entre os micropoços.

10.4.6 Segunda incubação

Colocar uma tampa por cima das placas e incubar os micropoços a **35-37°C** numa **caixa húmida** durante **30 minutos**.

10.4.7 Interromper a reacção

Adicionar 2 gotas (ou 100µL) de solução de paragem em cada micropoço. Assegurar a mistura completa nos micropoços. O produto colorido fica estável por 30 minutos. **Não expor a luz solar directa**, dado que pode ocorrer o branqueamento do produto colorido.

10.5. LER OS RESULTADOS DO TESTE

10.5.1 Leitura visual

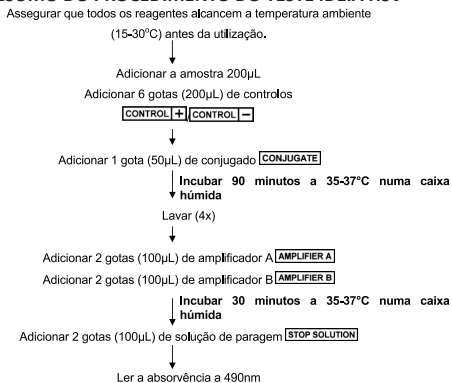
Os micropoços podem ser avaliados visualmente até 30 minutos após a adição da solução de paragem. Recomenda-se ler os micropoços fotometricamente quando a intensidade da cor for difícil de interpretar ao ser comparada com o controlo negativo (consultar a secção 10.5.2).

10.5.2 Leitura fotométrica

Os micropoços devem ser lidos fotometricamente dentro de 30 minutos após a adição da solução de paragem. Misturar o conteúdo dos micropoços e ler a absorvência de cada um utilizando um espectrofotómetro adequado ou um leitor de placas de EIA definido para 490nm. Assegurar que o fundo dos micropoços esteja limpo antes de ler e verificar se existe algum corpo estranho nos mesmos. O leitor deve ser branco em ar (i.e. sem nenhuma placa no transportador) antes da placa ser analisada.

De forma alternativa, se o espectrofotómetro ou o leitor de placas de EIA permitir a utilização do uso de um comprimento de onda de referência (620-650nm), a leitura de comprimento de onda dupla deve ser feita, de forma a eliminar qualquer interferência potencial causada por aberrações tais como sujeira ou marcas nas superfícies óticas dos micropoços.

10.6. RESUMO DO PROCEDIMENTO DO TESTE IDEIA HSV



11. CONTROLO DE QUALIDADE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO TESTE

11.1. CONTROLO NEGATIVO

Como detalhado na secção 10.4.1 (amostra e adição de controlo), devem ser incluídos em cada teste três micropoços de controlo negativo.

Determinação visual

Todos os micropoços de controlo negativos devem ser incolores ou apenas levemente rosados. Se não for este o caso, os resultados do teste não devem ser determinados visualmente. Os resultados devem ser lidos fotometricamente ou o teste repetido.

Determinação fotométrica

Os valores de absorvência do controlo negativo individual devem ser menores ou iguais a 0,30 unidades de absorvência. Os valores de absorvência do controlo negativo individual devem recair nas +0,05 unidades de absorvência da média dos três controlos negativos. Se um valor de absorvência do controlo negativo cair fora do limite aceite, exclua este valor e volte a calcular a média dos dois restantes. Se dois valores de absorvência do controlo negativo forem inaceitáveis o teste deve ser repetido.

Cálculo do valor de corte

O valor de corte é calculado adicionando 0,15 ao valor de absorvência do controlo negativo médio.

11.2. CONTROLO POSITIVO

Conforme detalhado na secção 10.4.1 (amostra e adição de controlo), deve ser incluído em cada teste um micropoço de controlo positivo.

Determinação visual

O micropoço de controlo positivo deve ter uma cor vermelha/magenta claramente distinta dos controlos negativos. Se não for este o caso, os resultados do teste não devem ser determinados visualmente. Os resultados devem ser lidos fotometricamente ou o teste repetido.

Determinação fotométrica

O micropoço de controlo positivo deve ter um valor de absorvência maior do que as 0,50 unidades de absorvência. Se não for o caso, o teste deve ser repetido.

11.3. AMOSTRAS

Determinação visual

Qualquer amostra com uma cor vermelha/magenta mais intensa do que a dos controlos negativos é positiva. Qualquer amostra com uma cor igual ou menos intensa à dos controlos negativos é negativa. Qualquer amostra com uma coloração levemente rosada próxima à dos controlos negativos deve ser lida fotometricamente ou testada novamente. Em alternativa, o doente deve fazer um novo teste.

Determinação fotométrica

As amostras clínicas que têm valores de absorvência maiores do que o valor de corte são positivas (consultar a secção 11.1). Um resultado dentro das unidades de absorvência 0,015 do valor de corte deve ser cuidadosamente interpretado, e dever-se-á repetir o teste ou recolher uma nova amostra do doente. Os resultados do doente não devem ser relatados se os controlos ficarem fora dos valores previstos.

11.4. INTERPRETAÇÃO E VERIFICAÇÃO DOS RESULTADOS DO TESTE

11.4.1 Interpretação dos resultados do teste

A seguinte tabela é um resumo do método recomendado para a interpretação e descrição dos resultados.

Tabela 11.4 Resumo da interpretação e descrição dos resultados

Resultado	Interpretação	Relatar recomendações
OD > CO + 0,015	Positivo*	Antígeno HSV hipotético (Não foi feito nenhum teste de bloqueio)
OD = CO ± 0,015	Equívoco*	Não é possível determinar o resultado. Testar novamente
OD < CO - 0,015	Negativo	Nenhum antígeno HSV detectado

OD = Densidade óptica (unidades de absorvência)

CO = Corte = Média de controlos negativos + Unidades de absorvência +0,15

* Recomenda-se a verificação dos resultados equívocos e positivos.

11.4.2 Verificação dos resultados do teste

Se a verificação das amostras consideradas reactivas no teste IDEIA HSV for considerada necessária, recomenda-se o uso do IDEIA HSV Blocking Reagents (nº de código S603330-2). O teste de bloqueio para a verificação dos resultados oferece meios adicionais de controlo de qualidade para a recolha de amostra.

12. LIMITES DO DESEMPENHO

12.1. A qualidade das amostras é crucial para o sucesso de todos os testes de diagnóstico. As amostras recolhidas devem conter tantos antígenos virais quanto possível (consultar a secção 9). Assim o resultado negativo não exclui a possibilidade de uma infecção HSV.

12.2. Para obter o desempenho ideal do teste é necessário usar o IDEIA HSV Transport Medium ou Extraction Buffer. As características do desempenho deste teste usando outro meio de transporte de cultura não foram validadas.

12.3. As características de desempenho deste teste para uso nos doentes assintomáticos, fluido espinal cerebral, biópsia tecidual ou amostras exsudadas do olho e para a confirmação da cultura tecidual não foram validadas.

12.4. Este teste detecta ambos os vírus herpex simplex tipos 1 e 2, mas não diferencia qual é o tipo infeccioso.

12.5. Este teste não deve ser usado como o único meio para diagnosticar o HSV quando for contemplada uma Secção Cesariana. Devem prevalecer os resultados de cultura anteriores (quando disponíveis) e a avaliação clínica.

12.6. Este teste pode detectar os antígenos HSV ou HSV de cultura negativa ou não viável.

12.7. Os resultados dos testes devem ser interpretados em conjunto com as informações disponíveis dos estudos epidemiológicos, avaliações clínicas do doente e outros procedimentos de diagnóstico.

13. VALORES PREVISTOS

As taxas de positividade podem variar de acordo com a prevalência do HSV em diferentes populações, localização geográfica, recolha de amostra, manuseio, transporte das amostras, comportamento sexual e o ambiente de saúde geral da população na qual se integra o doente sob estudo.

O vírus herpes simplex é uma infecção observada a nível mundial no homem e acima de 80% da população adulta nos países

ocidentais terão experimentado uma infecção primária, muitas das quais terão sido assintomáticas⁹. No seguimento da infecção primária, cerca de 45% de indivíduos infectados oralmente e 60% dos doentes com herpes genital experimentam infecções recorrentes¹⁰.

As infecções do vírus herpes simplex na vista são as maiores causas de consultas nas clínicas de oftalmologia¹⁰. O HSV foi isolado do tracto genital de 0,3 a 5,4% dos homens e 1,0 a 8,0% das mulheres, que eram tratados em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis^{11,12}.

Na infecção recorrente e primária assintomática, as lesões podem ser observadas na derme, membranas da mucosa da boca, faringe e órgãos genitais ou na vista. Durante as infecções neonatais ou nos indivíduos imunocomprometidos, a infecção pode tornar-se mais amplamente disseminada infectando órgãos tais como pulmão, cérebro, fígado, baço, etc.

O antígeno HSV pode estar presente e o vírus cultivado do fluido das lesões vesiculares, em micropoço, na saliva ou nas secreções de outros locais infectados, ex. olhos, faringe e órgãos genitais. Além disso, o HSV pode ser cultivado a partir de tecidos infectados no herpes disseminados, ex. biópsia do cérebro de doentes com encefalite causado por herpes simplex.

A probabilidade de detecção do HSV diminui com o tempo após o início da doença e o desenvolvimento das lesões. A probabilidade do isolamento viral diminui à medida que a lesão ulcera, cria crosta e cicatriza. As amostras devem ser recolhidas logo que possível depois do aparecimento das lesões⁵⁻⁶. Num estudo, o vírus foi recuperado em 94% das lesões vesiculares, 87% das lesões pustulares, 70% das úlceras e 27% das lesões em crosta⁷.

14. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

Todos os resultados fornecidos assumem que os métodos da cultura celular são 100% sensíveis e específicos.

14.1. ESTUDOS CLÍNICOS

O teste IDEIA HSV foi avaliado em comparação com os sistemas de cultura celular estabelecidos, em quatro laboratórios de diagnóstico de rotina independentes.

Um total de 1375 amostras clínicas humanas foi testado usando o teste IDEIA HSV e os resultados foram comparados aqueles do sistema de cultura celular empregado pelos centros de testes (tabela 14.1). Nestes estudos a prevalência da infecção HSV (pela cultura celular) foi de 12,7 a 36,9%.

Cada amostra foi marcada positiva no teste IDEIA HSV quando a leitura de absorvência da amostra a 492nm foi maior do que o valor de corte recomendado (consultar a secção 11.1). Uma amostra foi marcada como positiva na cultura celular, quando o efeito citopático característico do HSV foi observado.

As culturas celulares positivas foram tipadas usando imunofluorescência directa em dois dos centros de testes. Das 37* amostras positivas tipadas no centro 1,15/37 (40,5%) eram do tipo 1 e 22/37 (59,5%) eram do tipo 2. No centro 4, 14/71 (19,7%) eram do tipo 1 e 57/71 (80,3%) eram do tipo 2.

* (4 amostras positivas não estavam disponíveis para os estudos de tipagem).

O resultado do teste IDEIA HSV concordou com o resultado da cultura celular em 1302 de 1375 amostras, uma concordância geral de 94,7%.

A resolução de 29 resultados de testes IDEIA HSV “falso positivos” discrepantes, depois da consulta dos detalhes clínicos disponíveis fornece uma concordância geral final de 96,8% (1331/1375).

14.2. DESEMPENHO

Sensibilidade*

Em geral, a sensibilidade do teste IDEIA HSV foi de 93,6% (307/328).

Especificidade*

Em geral, a especificidade do teste IDEIA HSV foi de 97,8% (1024/1047).

Valores previstos*

Em geral, os valores positivos e negativos previstos do teste IDEIA HSV foram de 93,0% (307/330) e 98,0% (1024/1045) respectivamente.

*Após a resolução de 29 resultados de teste IDEIA HSV “falso positivos” discrepantes, (consultar a tabela 14.2).

Tabela 14.1: Comparação dos resultados do teste pelo IDEIA HSV Teste e Cultura Celular

ESTUDO	TESTE IDEIA HSV				VALORES PREVISTOS			
	% PREVALÊNCIA POR CULTURA	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE		POSITIVO	NEGATIVO		
1 (UK)	35,3% (41/116)	90,2% (37/41)	90,2% (74/75)	98,7% (74/75)	97,3% (37/38)	97,3% (37/38)	94,9% (74/78)	94,9% (74/78)
2 (UK)	36,9% (89/241)	89,9% (80/89)	90,2% (83/92)	94,1% (143/152)	89,9% (80/89)	93,3% (83/89)	94,1% (143/152)	94,1% (143/152)
3 (UK)	12,7% (98/774)	94,9% (93/98)	95,5% (106/111)	97,5% (659/676)	99,4% (659/663)	84,5% (93/110)	96,4% (106/110)	99,2% (659/664)
4 (US)	29,1% (71/244)	95,8% (68/71)	96,4% (81/84)	85,5% (148/173)	92,5% (148/160)	73,1% (68/93)	87,0% (81/93)	98,0% (148/151)
Total	93,0% (278/299)	93,6% (307/328)	95,2% (1024/1076)	97,8% (1024/1047)	84,2% (278/330)	93,0% (307/330)	98,0% (1024/1045)	98,0% (1024/1045)

* Os dados nestas colunas são os recalculados após a resolução de 29 resultados IDEIA “falsos positivos”. Estas amostras foram de doentes que ou foram testados positivos num local adjacente, tinham parceiros positivos ao HSV ou tinham história clínica anterior de HSV.

Tabela 14.2: Intra e Inter-ensaios de reprodutibilidade do IDEIA HSV Teste

Nível de antígeno	Intra-ensaio (n=3)									Inter-ensaio (n=9)		
	DIA 1			DIA 2			DIA 3			Médio	SD	% CV
	Médio	SD	% CV	Médio	SD	% CV	Médio	SD	% CV			
Negativo	0,105	0,005	4,9	0,104	0,006	5,4	0,108	0,005	4,6	0,106	0,005	5,0
Positivo baixo	0,275	0,010	3,5	0,287	0,010	3,7	0,247	0,003	1,2	0,270	0,019	7,0
Positivo elevado	1,279	0,079	6,2	1,205	0,080	6,6	1,100	0,037	3,4	1,195	0,100	8,4

14.3. PRECISÃO DO TESTE

A tabela 14.2 mostra os resultados dos estudos de precisão do teste para o teste IDEIA HSV.

As suspensões do controlo de 3 níveis do antígeno HSV no meio de transporte IDEIA HSV foram testadas em triplicado em três ocasiões separadas (um total de 9 ensaios). Os resultados são expressos nas unidades de absorvência a 492nm. As faixas observadas para o CV intra- e inter-ensaios foram de 1,2 a 6,6% e 5,0 a 8,4% respectivamente.

14.4. REACTIVIDADE CRUZADA

Os organismos constantes na lista seguinte, na concentração aproximada de 10⁷ organismos/mL para culturas não virais e aproximadamente 50-100% CPE para as culturas virais, foram considerados não reactivos com o teste IDEIA HSV.

Acholeplasma laidlawii *Mycoplasma spp*
Acinetobacter spp *Neisseria gonorrhoeae*
Aeromonas spp *Peptococcus spp*
Bacteroides spp *Peptostreptococcus spp*

Campylobacter spp *Proteus spp*
Candida spp *Pseudomonas spp*
Citrobacter spp *Salmonella spp*
Chlamydia trachomatis *Serratia spp*
Clostridium spp *Shigella spp*
Citomegalovirus *Staphylococcus aureus* (cowan 1 estirpe)
Enterobacter spp *Staphylococcus spp* (coag.neg)
Vírus Epstein Barr *Staphylococcus spp* (coag.pos)
Escherichia coli *Streptococcus spp*
Gardnerella spp *Trichomonas spp*
Haemophilus influenzae *Ureaplasma urealyticum*
Klebsiella spp *Vírus zoster da varicela*
Lactobacillus spp *Veillonella spp*
Listeria spp

15. REFERÊNCIAS

- Adam E. (1982)**
Herpes simplex virus infections. In Herpes virus infections clinical aspects
Glaser R, ed. Marcel Dekker Inc New York pp 1-55.
- Nahmias AJ and Josey WE (1976)**
Epidemiology of herpes simplex virus 1 and 2. In Viral infections of humans, Epidemiology and control.
Evans AS, ed J Wiley and Sons, London pp 253-271.
- Stanley CJ, Johannsson A and Self CH (1985)**
Enzyme amplification can enhance both the speed and the sensitivity of immunoassays.
Journal of Immunological Methods **83**: 89-95.
- Buckmaster A (1987)**
Monoclonal antibodies to HSV. In Herpes Simplex Virus: New technologies in diagnostics. Eds Freke A and Sherwood D. Boots-Celltech Diagnostics Ltd. Symposium Proceedings pp 16-20.
- Drew WL and Rawls WE (1985)**
Herpes Simplex Viruses
Chapter 64 in *Manual of clinical Microbiology*, Fourth edition, eds by Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr and Shadomy HJ, published by American Society for Microbiology, pp 705-710.
- Lennette DA (1985)**
“Collection and Preparation of Specimens for Virological Examination”, Chapter 61 in *Manual of Clinical Microbiology*, Fourth edition, eds by Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr and Shadomy HJ, published by American Society for Microbiology, pp 687-693.
- Moseley RC, Corey L, Benjamin D, Winter C and Remington ML (1981)**
Comparison of Viral Isolation, Direct Immunofluorescence and Indirect Immunoperoxidase Techniques for Detection of Genital Herpes Simplex Virus Infection.
Journal of Clinical Microbiology **13**: 913-918.
- “The (herpes) helper (1984)”** published by the American Social Health Association, Box 100, Palo Alto, CA 94302. Fall 1984 pp 7.
- Nahmias AJ and Roizman B (1973)**
Infection with herpes-simplex virus 1 and 2.
New England Journal of Medicine **289**: 667-74.
- Longson M (1987)**
Herpes simplex in Principles and Practice of Clinical Virology (eds AJ Zuckerman et al), John Wiley and Sons Limited. Chapter 1.1 pp 3-20.
- Corey L, Adams HG, Brown ZA and Holmes (1983)**
Genital herpes simplex virus infection: clinical manifestations course and complications.
Annals International Medicine **98**: 918-72.
- Corey L and Holmes KK (1983)**
Genital herpes simplex virus infections: current concepts in diagnosis, therapy and presentation.
Annals International Medicine **98**: 973-83.

ORIENTAÇÃO TÉCNICA E ASSISTÊNCIA AO CLIENTE

IFU X7845 Revisado dezembro 2013



OXOID Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 8PW, Grã-Bretanha

Para obter informações, contactar a subsidiária ou distribuidor Oxoid local.