



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

ES

Inmunoensayo enzimático amplificado para la detección directa del Virus del Herpes Simple en especímenes clínicos humanos de pacientes sintomáticos.

1. INDICACIONES DE USO

La prueba IDEIA™ Herpes Simplex Virus (HSV) es un inmunoensayo enzimático amplificado cualitativo para la detección directa del virus del herpes simplex (VHS) en especímenes clínicos humanos de pacientes sintomáticos.

2. RESUMEN

El VHS es un virus encapsulado que contiene ADN y es morfológicamente similar a los otros miembros del género Herpesviridae. Se reconocen dos tipos antigénicamente diferentes, llamados tipo 1 y tipo 2.

Ambos VHS 1 y 2 se encuentran frecuentemente involucrados en infecciones superficiales de la cavidad bucal, la piel, los ojos y los genitales^{1,2}. También se observan infecciones del sistema nervioso central (meningoencefalitis) e infecciones generalizadas graves en el neonato o el paciente inmunocomprometido, aunque es más raro. Una vez resuelta la infección primaria el virus puede existir en forma latente en el tejido nervioso y volver a aparecer en ciertas condiciones, provocando una recidiva de los síntomas.

Actualmente existen dos métodos principales de diagnóstico para la detección del VHS en especímenes clínicos. El primero, mediante el aislamiento del virus viable en células cultivadas seguido por la identificación del agente a través de métodos inmunológicos o por microscopía electrónica;^{1,2} el segundo, por demostración directa del antígeno vírico en especímenes clínicos utilizando un anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína o un inmunoensayo enzimático.

El aislamiento del virus en monocapas de cultivos celulares es laborioso, caro, consume mucho tiempo y requiere de cierto grado de pericia técnica que puede no estar disponible en muchos laboratorios.

La prueba IDEIA HSV es una prueba de diagnóstico alternativo para la detección directa del antígeno del virus del herpes en especímenes clínicos. La prueba utiliza anticuerpos monoclonales para detectar el antígeno de ambos VHS 1 y 2 y un sistema de amplificación enzimática para aumentar la señal de la prueba³. El inmunoensayo enzimático es fácil de realizar y más rápido que el aislamiento del virus para la detección del VHS en especímenes clínicos y cultivos celulares.

La prueba IDEIA HSV suministra todos los reactivos necesarios

para detectar al VHS en especímenes clínicos. La prueba se puede realizar en menos de dos horas utilizando instrumentos y procedimientos convencionales para inmunoensayo enzimático y brinda una sensibilidad (93,6%) y especificidad (97,8%) generales excelentes en comparación con los métodos de referencia para cultivo celular.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La prueba IDEIA HSV utiliza anticuerpos monoclonales murinos específicos y un sistema de amplificación enzimática³. El anticuerpo monoclonal murino adsorbido a la superficie del micropocillo plástico se liga al antígeno del VHS (común a los tipos 1 y 2) presente en un espécimen clínico. El anticuerpo monoclonal murino conjugado con la enzima se une al antígeno “capturado” y posteriormente la enzima cataliza la conversión del sustrato en producto. Este producto participa en una segunda reacción enzimática, que resulta en un cambio de color. El proceso de desarrollo del color es frenado mediante la adición de ácido. Una intensidad de color que esté significativamente por encima de los niveles del fondo indica la presencia del antígeno del VHS en especímenes clínicos (véase la Sección 9).

Agradecimientos

Los anticuerpos monoclonales proceden del Departamento de Anatomopatología, Universidad de Cambridge, Cambridge, Reino Unido⁴.

4. DEFINICIONES

En la información del producto se han utilizado los siguientes símbolos.

REF	Código del producto y número de catálogo
	Consulte las instrucciones de uso
	Contenido suficiente para <N> pruebas
	Fabricante
IVD	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fecha de caducidad
LOT	Código de Lote
	Límite de temperatura

5. REACTIVOS SUMINISTRADOS

96 – Cada kit contiene material suficiente para 96 determinaciones. - La vida útil del kit es la indicada en la etiqueta del embalaje exterior.

5.1. CONTENIDO DE LA PRUEBA IDEIA HSV

	Un folleto de instrucciones de uso.
MICROTITRATION PLATE	Una bolsa con una placa de 96 micropocillos dispuestos en 12 tiras separables recubiertas de anticuerpo monoclonal murino contra el VHS, de 8 micropocillos cada una. Se suministra una bolsa de plástico resellable para almacenar los micropocillos no utilizados.

Un frasco de cada uno de los siguientes:

TRANSPORT MEDIUM	100mL de medio de transporte: detergente no iónico en un tampón con tinte de color, agente antimicrobiano y agente antiespumante.
-------------------------	---

CONTROL +

3mL de control positivo: un homogenado inactivo de células HeLa infectadas con VHS en solución tampón que contiene proteína y detergente.

CONTROL -

12mL de control negativo: solución tampón que contiene un agente antimicrobiano, tinte de color y un agente antiespumante.

CONJUGATE

7mL de conjugado: anticuerpo monoclonal murino conjugado con fosfatasa alcalina (fragmento principal Fab) en tampón estabilizador que contiene tinte de color y un agente antimicrobiano.

WASH BUFFER (x10)

125mL de tampón de lavado concentrado (x10): solución tamponada con Tris que contiene detergente y un agente antimicrobiano.

AMPLIFIER A

13mL de amplificador A: sales inorgánicas y solución enzimática tamponada que contiene violeta de tetrazolio y un agente antimicrobiano.

AMPLIFIER B

13mL de amplificador B: solución de NADPH estabilizada.

STOP SOLUTION

13mL de solución de parada: 1 mol/L de ácido fosfórico.

5.2. PREPARACIÓN, ALMACENAMIENTO Y REUTILIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL KIT

El formato del kit IDEIA HSV permite hacer pruebas en un máximo de 12 lotes de especímenes. Para poder asegurar la eficacia óptima del kit, es importante almacenar todos los componentes no utilizados según las instrucciones.

5.2.1 Micropocillos recubiertos de anticuerpo monoclonal - **MICROTITRATION PLATE**

Abra la bolsa de la placa cortando el sello a lo largo. Desprenda la cantidad de micropocillos requeridos y reubíquelos en el marco. Ubique los micropocillos sin uso en la bolsa de plástico resellable con el desecante, vuelva a sellar la bolsa con cuidado y almacene a 2-8°C. Se puede utilizar los micropocillos hasta 6 semanas después de la apertura inicial, con la condición de que se almacenen de esta manera.

5.2.2 Medio de Transporte - **TRANSPORT MEDIUM**

Viene listo para usar. **Es importante mezclar el medio de transporte antes de usarlo.**

El agente antiespumante en el medio de transporte produce un aspecto turbio que no afecta a la prueba y no se debe a contaminación microbiana.

5.2.3 Control Positivo - **CONTROL +**

Listo para usar. Almacene el control positivo sin uso a 2-8°C.

5.2.4 Control Negativo - **CONTROL -**

Listo para usar. Almacene el control negativo sin uso a 2-8°C.

5.2.5 Conjugado - **CONJUGATE**

Listo para usar. Almacene el conjugado sin uso a una temperatura de 2-8°C.

5.2.6 Concentrado de tampón de lavado - **WASH BUFFER (x10)**

Se suministra a una concentración de 10X. Prepare el tampón de lavado a la concentración de trabajo requerida agregando una parte de concentrado de tampón de lavado a 9 partes de agua fresca desionizada o destilada. Se suministra suficiente concentrado para preparar hasta 100mL de tampón de lavado

a la concentración de trabajo requerida para cada tira de 8 micropocillos. **Prepare un tampón de lavado a la concentración de trabajo requerida, el día en que vaya a utilizarlo** (ver Sección 8.2.10). Almacene el concentrado no utilizado a 2-8°C.

No almacene tampón de lavado preparado a la concentración de trabajo requerida que no haya sido utilizado para usarlo posteriormente (véase la Sección 8.2.10).

5.2.7 Amplificador A - **AMPLIFIER A**

Listo para usar. Almacene el amplificador A no utilizado a 2-8°C.

5.2.8 Amplificador B - **AMPLIFIER B**

Listo para usar. Almacene el amplificador B no utilizado a 2-8°C.

5.2.9 Solución de Frenado - **STOP SOLUTION**

Listo para usar. Almacene la solución de frenado no utilizada a 2-8°C.

6. REACTIVOS ADICIONALES

6.1. REACTIVOS

Agua fresca desionizada o destilada para la preparación de tampón de lavado.

6.2. ACCESORIOS

Se deben usar los siguientes productos junto con el kit IDEIA HSV. Para obtener más información contacte con la delegación o el distribuidor local de Oxoid.

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

IDEIA HSV Blocking Reagent (No. de código S603330-2).

IDEIA *PCE* Chlamydia/HSV Wash Buffer Concentrate (10X) (No. de código S603930-2).

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

7. EQUIPAMIENTO

Se requiere el siguiente equipamiento:

Viales dotados de tapón de rosca, limpios

Mezclador vórtex

Papel absorbente limpio (sobre el que se puedan secar los micropocillos)

Pipetas de precisión y puntas desechables para administrar 50µL 1.000µL o pipetas tipo Pastette para administrar 200µL de espécimen (opcional)

Recipiente para desecho de desperdicios con desinfectante fresco apropiado

Incubador para incubar a 37°C.

Lavador automático de placas (opcional) o equipamiento apropiado para lavar tiras de 8 micropocillos (véase la Sección 10.4.4).

Nota: Si lava menos de 8 micropocillos de prueba en una tira utilizando un lavador automático con cabezal para 8 micropocillos, es importante llenar la tira por completo con micropocillos vacíos.

Espectrofotómetro o lector de placas de inmunoensayo enzimático (IEE) capaz de leer una placa de 96 micropocillos u 8 tiras de micropocillos midiendo la absorbancia a 490nm con una referencia a 620-650nm. (Opcional, véase la Sección 10.5, Lectura de los resultados de la prueba).

8. PRECAUCIONES

IVD - Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*. Cualquier persona que realice un ensayo con este producto debe estar entrenada en su uso y debe tener experiencia en los procedimientos de laboratorio.

8.1. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

8.1.1 Los siguientes reactivos contienen azida sódica (15mmol/L), que es tóxica, medio de transporte, conjugado, concentrado de tampón de lavado, control positivo, control negativo y reactivo amplificador A. La azida sódica puede reaccionar con los sistemas de cañerías de cobre y plomo y formar azidas metálicas explosivas. Deseche siempre los materiales que contengan azida aclarando con abundante agua.

8.1.2 La solución de parada contiene 1mol/L de ácido fosfórico. Evite que estos productos entren en contacto con los ojos y la piel usando prendas y gafas protectoras.

8.1.3 El control positivo contiene antígeno de VHS inactivado, que ha demostrado ser no infeccioso. Sin embargo, el control debe ser manipulado y desechado como material potencialmente infeccioso. El control positivo también contiene un detergente (1% v/v). Evite el contacto con la piel.

8.1.4 No se aplique cosméticos, beba, coma, ni almacene o prepare alimentos dentro del área de trabajo designada.

8.1.5 No pipetee los materiales con la boca.

8.1.6 Lleve guantes desechables cuando manipule especímenes clínicos y células infectadas, y lávese siempre las manos después de trabajar con materiales potencialmente infecciosos.

8.1.7 Deseche todos los especímenes clínicos y reactivos con arreglo a la legislación local.

8.1.8 La hoja de datos sobre seguridad se encuentra disponible a petición del usuario profesional.

8.2. PRECAUCIONES TÉCNICAS

8.2.1 Los componentes no deben usarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas. No mezcle ni intercambie lotes diferentes de reactivos.

8.2.2 Los reactivos se proporcionan a concentraciones de trabajo fijas. El rendimiento se verá afectado negativamente con cualquier tipo de modificación de los reactivos o si éstos se almacenan con arreglo a condiciones diferentes a las que se detallan en la Sección 5.2.

8.2.3 Evite la contaminación de los reactivos.

8.2.4 Cuando utilice el método de frasco dosificador asegúrese de que todos los controles y reactivos sean añadidos del mismo modo. (El rendimiento del kit puede verse afectado negativamente si se utiliza una combinación de pipeta y frasco dosificador).

8.2.5 Evite utilizar muestras diferentes de reactivos de amplificación. Transfiera la cantidad requerida a un vaso limpio apropiado. No vuelva a colocar el exceso de reactivo en el frasco dosificador.

8.2.6 Use distintas pipetas o puntas de pipeta desechables para cada espécimen, control o reactivo (si no usa frascos dosificadores) para evitar la contaminación cruzada de cualquiera de los especímenes, controles o reactivos lo que causaría resultados erróneos.

8.2.7 Almacene el agua desionizada o destilada para dilución de reactivos concentrados en recipientes limpios para prevenir la contaminación microbiana.

8.2.8 Asegúrese de que no exista contaminación cruzada entre los micropocillos en todas las etapas de la prueba. Es esencial que no permita que el conjugado contamine otros reactivos o a los equipos. Si no utiliza el método de frasco dosificador reserve una pipeta aparte para administrar el conjugado y otra pipeta diferente para administrar los reactivos amplificadores. Evite tocar o salpicar con conjugado el borde del micropocillo. Si deja que el conjugado se seque en el borde del micropocillo puede afectar negativamente la eficacia de la prueba.

8.2.9 No se pueden reutilizar los micropocillos.

8.2.10 No almacene tampón de lavado preparado a la concentración requerida para su uso posterior. Cuando no utilice los reservorios de tampón de lavado debe aclararlos con agua desionizada o destilada y dejarlos secar.

8.2.11 El sistema de amplificación enzimática es un detector altamente sensible de moléculas de fosfatasa alcalina. **Es muy importante eliminar todo el conjugado no ligado lavando concienzudamente los micropocillos antes de agregar reactivos de amplificación.** El lavado cuidadoso de micropocillos se logra utilizando las técnicas detalladas en la Sección 10.4.4. Un lavado ineficaz puede conducir a resultados incorrectos.

8.2.12 El equipo de lavado manual o automático debe estar libre de contaminación microbiana; además, se lo debe calibrar correctamente y mantener de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

8.2.13 No debe usar solución salina tamponada con fosfatos (PBS) y otras soluciones de lavado que contengan fosfato con el ensayo, para prevenir inhibición del conjugado enzimático que podría afectar la eficacia de la prueba. Debe aclarar concienzudamente con agua desionizada o destilada los equipos de lavado que se utilizaron con soluciones de lavado que utilizan fosfato antes de cebarlo con tampón de lavado IDEIA PCE Chlamydia/HSV a la concentración de trabajo requerida (No. de código S603930-2).

9. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE ESPECÍMENES

Se puede utilizar el kit de IDEIA HSV para analizar los especímenes recolectados de la siguiente manera:

Especímenes recogidos en el medio de transporte de IDEIA HSV (véase la Sección 9.3.1).

Especímenes recogidos en medio de transporte para aislamiento de virus en monocapas de cultivo celular (véase la Sección 9.3.1).

9.1. MEDIO DE TRANSPORTE

Si para la recogida del espécimen va a utilizar el medio de transporte de IDEIA HSV, dispense una alícuota de 1mL de medio de transporte para espécimen en viales limpios dotados de tapón de rosca. Se pueden almacenar las alícuotas de 1mL a 2-8°C durante 12 meses o hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. Almacene a temperatura ambiente (15-30°C) durante 6 meses.

Nota: Es importante mezclar concienzudamente o procesar en vórtex el medio de transporte antes de dispensar o usar. El medio de transporte contiene un agente antiespumante que hace que el medio se vea turbio. Esto no afecta a la prueba y

no se debe a contaminación microbiana. El medio de transporte contiene un detergente fuerte que hace que el espécimen sea inadecuado para cultivo celular.

9.2. RECOGIDA DE ESPECÍMENES

Es esencial utilizar una buena técnica de toma de muestras para la detección óptima del VHS en especímenes clínicos. Los especímenes tomados de una lesión clínica deben ser recogidos por individuos calificados con un hisopo estéril. Los especímenes deben contener la mayor cantidad de material infectado posible. Se recomienda usar hisopos estériles con punta de algodón o Dacron® con mangos de papel o plásticos.

Las cremas, pomadas, lociones, hielo, alcohol, soluciones antisépticas tóxicas que contengan yodo, zinc, o un baño Sitz reciente reducen significativamente la carga vírica. Se debe evitar, en la medida de lo posible, el uso de tales medicamentos antes de la recogida de los especímenes o debe informarse al médico cuando se toma la muestra de la lesión.

9.2.1 Especímenes clínicos

Se deben frotar firmemente las úlceras con el hisopo para recolectar células y exudado infectado de la base de la úlcera. Se debe abrir con cuidado las vesículas, recoger el fluido y frotar la base de la lesión con el hisopo. Coloque el hisopo en un vial dotado de tapón de rosca limpio con el medio de transporte apropiado. Las lesiones pustulosas deben ser tratadas como vesículas; se pueden agregar las costras al medio de transporte en un vial dotado de tapón de rosca o se pueden enviar secas. Puede almacenar los especímenes a 2-8°C durante no más de 3 días.

Los especímenes rectales o anorectales pueden dar lugar a resultados falso positivos si están contaminados con materia fecal. Estos se pueden confirmar con los IDEIA HSV Blocking Reagents (N° de código S603330-2).

9.2.2 Especímenes de cuello uterino en pacientes sintomáticas

Pase el hisopo firmemente por las lesiones visibles o por el cuello uterino. Retire el hisopo sin tocar la superficie vaginal y colóquelo en un vial dotado de tapón de rosca con el medio de transporte apropiado. Puede almacenar los especímenes a 2-8°C durante no más de 3 días.

9.3. PROCESAMIENTO DE LOS ESPECÍMENES

9.3.1 Hisopados en IDEIA HSV Transport Medium

Procese las muestras en vórtex antes de realizar la prueba y proceda a la Sección 10.2.

9.3.2 Hisopos en medio de transporte para el aislamiento del virus

Se necesita IDEIA HSV Extraction Buffer (N° de código S601230-2) para procesar los hisopados recogidos en medio de transporte de laboratorio para aislamiento de virus. Se deben procesar las muestras para la prueba con IDEIA HSV únicamente después de la inoculación en monocapas de cultivo celular ya que el tratamiento con tampón de extracción concentrado hace que el espécimen se vuelva inadecuado para el aislamiento del virus.

Agregue 100µL de tampón de extracción (N° de código S601230-2) a 900µL de medio de transporte para virus. Procese la muestra según el procedimiento descrito en la Sección 10.2.

No use el medio de transporte provisto en el kit para procesar los hisopados en medio de transporte vírico, ya que esto no permitirá una extracción óptima del antígeno de VHS del hisopo.

10. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

POR FAVOR CONSULTE LAS PRECAUCIONES TÉCNICAS DE LA SECCIÓN 8.2. ANTES DE REALIZAR EL PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

10.1. PREPARACIÓN DE LOS CONTROLES

Control negativo

Mezcle en vórtex el control negativo durante un **mínimo de 15 segundos**. Agregue el reactivo directamente a los micropocillos correspondientes.

Control Positivo

Mezcle en vórtex el control positivo durante **1 minuto**. Agregue el reactivo directamente al micropocillo correspondiente. Si fuera necesario, puede probar un control adicional con un nivel más bajo de reactividad para monitorizar la eficacia del kit.

10.2. TRATAMIENTO DE ESPECÍMENES Y CONTROLES

Mezcle en vórtex todos los especímenes (véase la Sección 9.3) y los controles procesados durante 15 segundos antes de agregarlos a los micropocillos.

10.3. ALMACENAMIENTO DE LOS ESPECÍMENES TRATADOS

Los especímenes pueden ser almacenados a -20°C hasta 4 semanas después de procesados. Si realiza la prueba en especímenes congelados, deje descongelar a temperatura ambiente (15-30°C), luego procéselos vigorosamente en vórtex durante un mínimo de 1 minuto inmediatamente antes de realizar la prueba.

10.4. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Se recomienda el uso de métodos apropiados para la adición de reactivos a los micropocillos durante todo el procedimiento de la prueba, es decir puntas de pipeta, frascos dosificadores o sondas automáticas. En los lotes pequeños de pruebas el uso de frascos dosificadores evita el ingreso reiterado de las puntas de las pipetas en los frascos de reactivo.

10.4.1 Adición del espécimen y el control

Ubique el número de micropocillos requerido en la placa de micropocillos. Agregue 200µL de especímenes a los micropocillos apropiados. Agregue 6 gotas (ó 200µL) de control negativo y control positivo a micropocillos diferentes. (Se deben incluir al menos tres micropocillos de control negativo y uno de control positivo en cada lote de especímenes sometidos a la prueba).

10.4.2 Adición del conjugado

Luego de agregar todos los especímenes y controles, agregue 1 gota (ó 50µL) de conjugado a cada micropocillo. **Evite que la punta de la pipeta o del frasco dosificador se sumerja en los micropocillos cuando dispense el conjugado ya que esto puede provocar una contaminación cruzada entre los micropocillos. También evite que el conjugado entre en contacto con la parte superior o contamine los micropocillos, ya que la eficacia de la prueba se vería afectada negativamente.**

10.4.3 Primera incubación

Coloque un tapón sobre las placas e incube los micropocillos a **35-37°C** durante **90 minutos** en una **cámara húmeda**.

10.4.4 Lavado de los micropocillos

Se deben lavar los micropocillos con tampón de lavado fresco a la concentración de trabajo requerida (véase la Sección 5.2.6).

La técnica de lavado es de vital importancia para la eficacia de la prueba (véase la Sección 8.2.10) y debe llevarse a cabo de modo de asegurar el llenado (con un mínimo de 350µL tampón de lavado a la concentración de trabajo requerida) y el vaciado completo de los micropocillos.

Es esencial realizar cuatro ciclos de lavado, con la técnica de lavado automático o manual, que deben incluir un período de empapado de 2 minutos durante el segundo lavado o un período de empapado total de 2 minutos durante el ciclo completo.

Lavado manual

Si lava los micropocillos a mano, aspire o sacuda el contenido de los micropocillos y use tampón de lavado recién preparado; asegúrese el llenado y vaciado completo de los micropocillos. Entre cada uno de los pasos de lavado, retire todo el tampón de lavado que quede; para ello, coloque los pocillos en posición invertida y golpéelos suavemente sobre un material absorbente limpio. La eficacia del lavado manual es aún mayor si el tampón de lavado se vierte en ángulo de modo de producir un vórtex en los micropocillos. Después del lavado final, debe invertir la placa y golpearla suavemente sobre papel absorbente para remover los últimos vestigios de tampón de lavado.

Lavado Automático

Debe programar el lavador automático para que complete 4 ciclos de lavado y adicione el tiempo equivalente a 2 minutos de tiempo de empapado durante todo el ciclo de lavado. Debe calibrar correctamente los lavadores para asegurar el llenado y vaciado completo de los micropocillos entre cada lavado. Después del lavado final, debe invertir la placa y golpearla suavemente sobre papel absorbente para eliminar los últimos vestigios de tampón de lavado.

10.4.5 Agregado de amplificador

Agregue 2 gotas (ó 100µL) de amplificador A a cada micropocillo.

Agregue 2 gotas (ó 100µL) de amplificador B a cada micropocillo.

Evite que los micropocillos entren en contacto con las puntas de los goteros o pipetas cuando dispense los amplificadores A y B, ya que esto puede provocar la contaminación cruzada de los micropocillos.

10.4.6 Segunda incubación

Coloque un tapón sobre las placas e incube los micropocillos a **35-37°C** durante **30 minutos** en **cámara húmeda**.

10.4.7 Parada de la reacción

Agregue 2 gotas (o 100µL) de solución de parada a cada micropocillo. Asegúrese de mezclar a fondo en los micropocillos. El producto coloreado es estable durante 30 minutos. **No exponga a la luz solar directa** ya que se puede producir fotodecoloración del producto coloreado.

10.5. LECTURA DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA

10.5.1 Lectura Visual

Puede evaluar visualmente a los micropocillos hasta 30 minutos después de la adición de la solución de parada. Se recomienda una lectura fotométrica adicional de los micropocillos en los que la intensidad del color sea difícil de interpretar cuando se los compara con el control negativo (véase la Sección 10.5.2.).

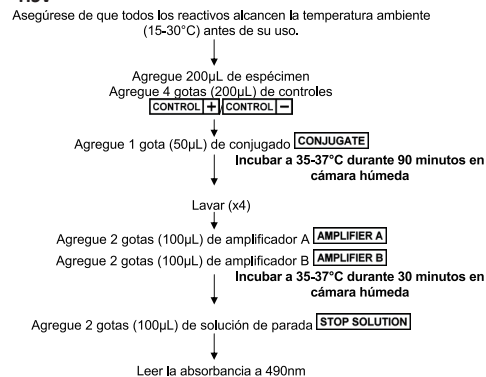
10.5.2 Lectura Fotométrica

Se debe leer fotométricamente a los micropocillos dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada. Mezcle los contenidos de los micropocillos y lea la absorbancia de

cada uno utilizando un espectrofotómetro apropiado o un lector de placas de inmunoensayo enzimático (IEE) a 490nm. Asegúrese de que los fondos de los micropocillos estén limpios antes de la lectura y controle que no haya materiales extraños presentes en los mismos. Se debe calibrar el lector a cero sobre aire (es decir, sin placa en el carro) antes de escanear la placa.

Como alternativa, en el caso de que el espectrofotómetro o el lector de placas IEE permitan el uso de una longitud de onda de referencia (a 620-650nm), se debe llevar a cabo una lectura de doble longitud de onda que eliminará cualquier interferencia potencial provocada por aberraciones sobre la superficie óptica de los micropocillos, tales como suciedad o marcas.

10.6. RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO DE ENSAYO IDEIA PARA HSV



11. CONTROL DE CALIDAD E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA

11.1. CONTROL NEGATIVO

Como se detalló en la Sección 10.4.1 (Agregado de espécimen y control), se deben incluir tres micropocillos con control negativo en cada ensayo.

Determinación visual

Todos los micropocillos con control negativo deben ser incoloros o sólo levemente rosados. Si no fuera de este modo, los resultados de la prueba no se deben determinar visualmente. Debe leer los resultados fotométricamente o repetir la prueba.

Determinación fotométrica

Cada valor de absorbancia del control negativo debe ser inferior o igual a 0,30 unidades de absorbancia. Cada valor de absorbancia del control negativo debe estar dentro de + 0,05 unidades de absorbancia del promedio de los tres controles negativos. Si un valor de absorbancia del control negativo cae fuera del rango aceptado, excluya este valor y recalculé el promedio de los dos restantes. Si dos valores de control negativo son inaceptables debe repetir la prueba.

Cálculo del valor del punto de corte

El valor del punto de corte se calcula sumando 0,15 al valor promedio de absorbancia del control negativo.

11.2. CONTROL POSITIVO

Como se detalló en la Sección 10.4.1 (Adición del espécimen y del control), se debe incluir un micropocillo con control negativo en cada ensayo.

Determinación visual

El micropocillo de control positivo debe ser de un color rojo/magenta claramente distinguible de los controles negativos.

Si no fuera de este modo, los resultados de la prueba no se deben determinar visualmente. Debe leer los resultados fotométricamente o repetir la prueba.

Determinación fotométrica

El micropocillo de control positivo debe tener un valor de absorbancia de más de 0,50 unidades de absorbancia. Si este no es el caso, debe repetir la prueba.

11.3. ESPECÍMENES

Determinación visual

Todo espécimen que de un color rojo/magenta más intenso que el de los controles negativos es positivo. Todo espécimen que de un color de intensidad igual o inferior al de los controles negativos es negativo. Todos los especímenes que den una coloración rosa pálido similar a la de los controles negativos deben ser leídos fotométricamente o se debe repetir la prueba. De otro modo, se deben tomar nuevas muestras del paciente.

Determinación fotométrica

Los especímenes clínicos que tengan valores de absorbancia mayores al valor de punto de corte son positivos (véase la Sección 11.1). Los resultados dentro de las 0,015 unidades de absorbancia del punto de corte deben interpretarse con precaución y se debe repetir la prueba o tomarse una nueva muestra al paciente. No se deben informar los resultados del paciente si los controles están fuera de los valores esperados.

11.4. INTERPRETACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA

11.4.1 Interpretación de los resultados de la prueba

La siguiente tabla es un resumen de los resultados de interpretación e informe recomendados.

Tabla 11.4 Resumen de la interpretación de los resultados y del informe recomendado

Resultado	Interpretación	Recomendaciones de Informe
DO > PC + 0,015	Positivo*	Probable antígeno del VHS (No se realizó prueba de bloqueo)
DO = PC ± 0,015	Equívoco*	No se pudo determinar el resultado. Repetir la prueba
DO < PC - 0,015	Negativo	No se detectó antígeno del VHS

DO = Densidad Óptica (Unidades de absorbancia)

PC = Punto de corte = Promedio de los controles negativos + 0,15 Unidades de absorbancia

* Los resultados positivos y equívocos deben ser verificados.

11.4.2 Verificación de los Resultados de la Prueba

Si se considera necesario realizar la verificación de los especímenes que hayan demostrado ser reactivos en la prueba IDEIA HSV, se recomienda el uso de IDEIA HSV Blocking Reagents (N° de código S603330-2). La prueba de bloqueo para la verificación de los resultados es un método adicional para controlar aspectos de la calidad de la recogida de especímenes.

12. LIMITACIONES DE EFICACIA

12.1. La calidad del espécimen es crucial para el éxito de las pruebas de diagnóstico. Los especímenes recogidos deben contener tanto antígeno vírico como sea posible (véase la Sección 9). De este modo, un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección por VHS.

12.2. Para obtener una eficacia óptima de la prueba se debe usar IDEIA HSV Transport MEDIUM o IDEIA HSV Extraction Buffer. No se evaluaron las características del rendimiento de esta prueba con otros medios de transporte de cultivo.

12.3. No se validaron las características del rendimiento de

esta prueba en pacientes asintomáticos, especímenes de líquido cerebroespinal, biopsia de tejidos o exudado ocular y para confirmación de cultivos tisulares.

12.4. Esta prueba detecta ambos tipos 1 y 2 de los virus del herpes simple pero no diferencia cuál es el tipo infectante.

12.5. Esta prueba no se debe utilizar como único método para diagnosticar el VHS cuando se contempla la posibilidad de una cesárea. Deben prevalecer los resultados de cultivos previos (cuando estén disponibles) y el mejor juicio clínico.

12.6. Esta prueba puede detectar VHS o antígenos del VHS no viables o que no crecen en cultivos.

12.7. Los resultados de la prueba deben ser interpretados en conjunto con la información disponible proveniente de los estudios epidemiológicos, la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.

13. VALORES ESPERADOS

Los índices de positividad pueden variar en relación a la prevalencia del VHS en diferentes poblaciones, ubicación geográfica, recogida de especímenes, manipuleo, almacenamiento, transporte de especímenes, conducta sexual y el medioambiente sanitario general de la población de pacientes en estudio.

La infección por el virus del herpes simplex se desarrolla en el hombre y se extiende por todo el mundo y más del 80% de la población adulta en los países occidentales habrá experimentado una infección primaria, de las cuales muchas habrán sido asintomáticas⁹. Después de la infección primaria alrededor de un 45% de los individuos infectados por vía oral y un 60% de los pacientes con herpes genital experimentarán infecciones recidivantes¹⁰.

Las infecciones oculares por virus del herpes simple son la mayor causa de referencia a las clínicas oftalmológicas¹⁰. Se aisló el VHS del tracto genital de 0,3 a 5,4% de los hombres y 1,0 a 8,0% de las mujeres que asistieron a clínicas de enfermedades de transmisión sexual^{11,12}.

En la infección sintomática, tanto en la primaria como en la recurrente, se pueden encontrar lesiones en la dermis, las membranas mucosas de boca, faringe y genitales o en el ojo. En las infecciones en neonatos o en individuos inmunocomprometidos, la infección puede diseminarse en forma más generalizada, infectando órganos como el pulmón, cerebro, hígado, bazo, etc.

El antígeno del VHS puede estar presente y el virus ser cultivado a partir del fluido de las lesiones, así como de saliva o secreciones de otros sitios infectados, por ejemplo ojos, faringe o genitales. Además, se puede cultivar el VHS de tejidos infectados en el herpes diseminado, por ejemplo, biopsia cerebral de pacientes con encefalitis por herpes simplex.

La posibilidad de detectar el VHS disminuye con el tiempo, después de la aparición de la enfermedad y del desarrollo de las lesiones. La probabilidad de aislar el virus disminuye a medida que la lesión se ulcera, se forma la costra y se sana. Se deben recoger los especímenes tan pronto como sea posible luego de la aparición de las lesiones^{5,6}. En un estudio, se recuperaron virus de 94% de las lesiones vesiculares, 87% de las lesiones pustulosas, 70% de las úlceras y 27% de las lesiones con costras⁷.

14. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE LA EFICACIA

Todos los resultados suministrados asumen que los métodos de cultivo celular son 100% sensibles y específicos.

14.1. ESTUDIOS CLÍNICOS

La prueba IDEIA HSV se evaluó contra sistemas de cultivo celular establecidos en cuatro laboratorios para diagnóstico de rutina independientes.

Se realizaron pruebas a un total de 1375 especímenes clínicos humanos usando la prueba IDEIA HSV y se compararon los resultados con los del sistema de cultivo celular empleado por los centros de ensayo (Tabla 14.1). En estos estudios la incidencia de infección por VHS (por cultivo celular) fue de 12,5 a 36,9%.

Cada espécimen fue calificado como positivo en la prueba IDEIA HSV cuando la lectura de absorbancia del espécimen a 492nm fue mayor que el valor de corte recomendado (véase la Sección 11.1). Los especímenes de cultivo celular se calificaron como positivos cuando se observó el efecto citopático característico del VHS.

El tipaje de los cultivos celulares positivos se realizó mediante inmunofluorescencia directa en dos de los centros de ensayo. De los 37* especímenes positivos tipados en el Centro 1, 15 de 37 (40,5%) eran tipo 1 y 22 de 37 (59,5%) eran tipo 2. En el Centro 4, 14 de 71 (19,7%) eran tipo 1 y 57 de 71 (80,3%) eran tipo 2.

*(Hubo 4 especímenes positivos que no estuvieron disponibles para estudios de tipaje).

Los resultados de la prueba IDEIA HSV coincidieron con los del cultivo celular en 1302 de 1375 especímenes, una coincidencia general del 94,7%.

La resolución de los 29 resultados “falsos positivos” discrepantes en la prueba de IDEIA HSV luego de obtener referencia a los detalles clínicos disponibles da una coincidencia general final de 96,8% (1331 de 1375).

14.2. EFICACIA

Sensibilidad*

En general, la sensibilidad de la prueba IDEIA HSV fue del 93,6% (307/328).

Especificidad*

En general, la especificidad de la prueba IDEIA HSV fue del 97,8% (1024 de 1047).

Valores predictivos

En general, los valores predictivos positivos y negativos de la prueba IDEIA HSV fue del 93,0% (307 de 330) y del 98,0% (1024 de 1045), respectivamente.

*Luego de la resolución de 29 resultados “falsos positivos” discrepantes con la prueba IDEIA HSV, (véase la Tabla 14.2).

Tabla 14.1 Comparación de los Resultados de la Prueba realizada con IDEIA HSV y Cultivo Celular

ESTUDIO	PRUEBA IDEIA HSV				VALORES PREDICTIVOS			
	% DE INCIDENCIA POR CULTIVO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD		POSITIVO	NEGATIVO		
		*	*		*	*		
1 (RU)	35,3% (41/116)	90,2% (37/41)	90,2% (37/41)	98,7% (74/75)	97,3% (37/38)	97,3% (37/38)	94,9% (74/78)	94,9% (74/78)
2 (RU)	36,5% (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 (RU)	12,7% (98/774)	94,9% (93/98)	95,5% (106/111)	97,5% (659/676)	94,4% (93/110)	96,4% (106/110)	99,2% (659/664)	99,2% (659/664)
4 (EEUU)	29,1% (71/244)	95,8% (68/71)	96,4% (81/84)	85,5% (148/173)	92,5% (68/73)	87,0% (81/93)	98,0% (148/151)	98,0% (148/151)
Total	93,0% (278/299)	93,6% (307/328)	95,2% (1024/1076)	97,8% (1024/1047)	88,2% (278/330)	93,0% (307/330)	98,0% (1024/1045)	98,0% (1024/1045)

* Los datos en estas columnas son los recalculados luego de la resolución de los 29 resultados “falso positivo” con IDEIA. Estos especímenes eran de pacientes que habían tenido una prueba positiva en un sitio adyacente, tenían parejas infectadas con el VHS o tenían antecedentes de infección por VHS.

Tabla 14.2 Reproducibilidad Intra y Entre ensayo de la prueba IDEIA HSV

Nivel de antígeno	Intraensayo (n=3)												Interensayo (n=9)		
	DIA 1			DIA 2			DIA 3			Promedio	DE	% CV			
	Promedio	DE	% CV	Promedio	DE	% CV	Promedio	DE	% 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			
Poco Positivo	0,275	0,010	3,5	0,287	0,010	3,7	0,247	0,003	1,2	0,270	0,019	7,0			
Muy Positivo	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. PRECISIÓN DEL ENSAYO

La Tabla 14.2 muestra los resultados de los estudios de precisión de ensayo para la prueba IDEIA HSV.

Se analizaron suspensiones de control de tres niveles de antígeno del VHS en el medio de transporte IDEIA HSV por triplicado en tres ocasiones diferentes (un total de 9 ensayos). Los resultados se expresan en unidades de absorbancia a 492nm. Los rangos de CV intraensayo e interensayo observados fueron 1,2 a 6,6% y 5,0 a 8,4% respectivamente.

14.4. REACTIVIDAD CRUZADA

Se encontró que los organismos de la siguiente lista, a una concentración aproximada de 10⁷ organismos/ml para cultivos no virales y aproximadamente 50-100% ECP para cultivos virales, no eran reactivos a la prueba IDEIA HSV.

<i>Acholeplasma laidlawii</i>	<i>Especies de Micoplasma</i>
<i>Especies de Acinetobacter</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Especies de Aeromonas</i>	<i>Especies de Peptococcus</i>
<i>Especies de Bacteroides</i>	<i>Especies de Peptostreptococcus</i>
<i>Especies de Campylobacter</i>	<i>Especies de Proteus</i>
<i>Especies de Candida</i>	<i>Especies de Pseudomonas</i>
<i>Especies de Citrobacter</i>	<i>Especies de Salmonella</i>
<i>Chlamidia trachomatis</i>	<i>Especies de Serratia</i>
<i>Especies de Clostridium</i>	<i>Especies de Shigella</i>
Citomegalovirus	<i>Staphylococcus aureus</i> (cepa Cowan 1)

Especies de Enterobacter
Especies de Staphylococcus
(coag. neg.)

Virus de Epstein-Barr
Especies de Staphylococcus
(coag. pos.)

Especies de Streptococcus
Especies de Gardnerella
Especies de Trichomonas
Haemophilus influenzae
Ureaplasma urealyticum
Especies de Klebsiella
Virus de la varicela zóster
Especies de Lactobacillus
Especies de Veillonella

15. REFERENCIAS

1. Adam E. (1982)

Herpes simplex virus infections. In Herpes virus infections clinical aspects
Glaser R, ed. Marcel Dekker Inc New York pp 1-55.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. “The (herpes) helper (1984)”

published by the American Social Health Association, Box 100, Palo Alto, CA 94302. Fall 1984 pp 7.

9. Nahmias AJ and Roizman B (1973)

Infection with herpes-simplex virus 1 and 2.
New England Journal of Medicine **289**: 667-74.

10. 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.

11. 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.

12. Corey L and Holmes KK (1983)

Genital herpes simplex virus infections: current concepts in diagnosis, therapy and presentation.
Annals International Medicine **98**: 973-83.

SERVICIO DE ASISTENCIA TÉCNICA Y ATENCIÓN AL CLIENTE

IFU X7845 Revisado el diciembre 2013



OXOID Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 8PW, Reino Unido

Para cualquier pregunta, por favor, contacte con la delegación o el distribuidor local de Oxoid.