

APLICACIÓN

El sistema de pruebas ELISA Herpes Simplex Virus-2 (HSV-2) IgG de ZEUS es un ensayo enzimático inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) diseñado para la determinación cualitativa de anticuerpos de tipo IgG contra el virus del herpes simple (VHS) en suero humano. El sistema de pruebas está diseñado para la evaluación de evidencias serológicas de infección primaria o reactivada por VHS. Debido a la reactividad cruzada de los antígenos compartidos, ambas pruebas (ELISA VHS-1 y VHS-2) deben realizarse en paralelo en la misma muestra para poder evaluar completamente el suero de un paciente. Esta prueba es para uso diagnóstico *in vitro*. **IMPORTANTE: es posible que los métodos serológicos para VHS que utilizan preparados de virus enteros no puedan diferenciar un resultado positivo entre el VHS-1 y VHS-2 en la mayoría de las muestras de pacientes debido a la reacción cruzada entre los antígenos comunes a ambos virus. Consulte más detalles en la sección Limitaciones de este prospecto.**

IMPORTANCIA Y ASPECTOS GENERALES

Las infecciones por el virus del herpes simple están causadas por dos tipos de antígenos diferentes, VHS-1 y VHS-2 (1). Ambos tipos de VHS son patógenos humanos comunes. El VHS-1 suele asociarse a las infecciones en la zona orofaríngea y en los ojos, mientras que el VHS-2 causa la mayoría de las infecciones genitales y en neonatos (1,2). Sin embargo, la especificidad de tejidos no es absoluta (3). El VHS-2 puede aislarse en el área orofaríngea ocasionalmente, y entre el 5 y el 10% de las infecciones genitales primarias pueden estar causadas por VHS-1 (1,4).

Las infecciones por VHS se clasifican en primarias y recurrentes. Tras la primera infección, se establece una infección latente en las neuronas sensoras, y la infección recurrente está provocada por la reactivación de la infección latente (2). Las infecciones recurrentes suelen ser menos graves y duran menos que la primera infección (1). Las infecciones por VHS suelen localizarse en el lugar donde se produjo la infección inicial. No obstante, las personas con sistemas inmunológicos disminuidos pueden sufrir infecciones locales graves o diseminadas. Entre dichas personas se incluyen los neonatos y los pacientes sometidos a terapia inmunosupresiva, como los receptores de trasplantes y los enfermos de cáncer (1,2).

Las infecciones por VHS se transmiten por secreciones que contienen el virus, mediante contacto físico íntimo. Las infecciones por VHS, tanto primarias como recurrentes, se presentan con frecuencia de forma subclínica y asintomática. La expulsión del virus es el factor que más contribuye a su propagación (2). Entre el 75 y el 90% de las personas en situación socioeconómica baja adquieren los anticuerpos contra el VHS antes de cumplir los 10 años de edad (5,7). En personas de situación socioeconómica más favorecida, entre el 30 y el 40% son seropositivos al alcanzar los 15 años de edad (5).

Las infecciones primarias por VHS-1 en la mucosa oral suelen producirse en niños menores de 5 años (2). La mayoría de las infecciones son asintomáticas. Las infecciones sintomáticas se caracterizan por gingivostomatitis asociada con fiebre, malestar e inflamación y sensibilidad a la presión en los nódulos linfáticos cervicales (2). Se forman numerosas vesículas en la mucosa oral, que posteriormente se ulceran y se curan en un par de semanas. La forma recurrente más común del VHS-1 es el herpes labial, con vesículas en los labios, las fosas nasales y la piel situada alrededor de la boca (1,2). Los síntomas de las infecciones genitales por VHS son la aparición de múltiples heridas ulceradas, acompañadas de dolor, fiebre, disuria y linfadenopatía (6). La complicación más grave de la infección genital por VHS es la enfermedad en neonatos (2).

A diferencia del citomegalovirus, el VHS no suele cruzar la placenta para infectar al feto *in utero* (1). El VHS se transmite de la madre al neonato en el momento del parto (1). El lactante adquiere la infección al atravesar un canal del parto infectado o si las membranas han estado rotas más de seis horas (6). En madres con una infección primaria activa, el riesgo de transmisión al niño llega hasta el 40% (5). Entre el 69 y el 80% de los niños que desarrollan herpes neonatal nacen de mujeres que no muestran síntomas de infección genital por VHS en el momento del parto (5).

Los lactantes infectados con VHS parecen normales en el momento del parto, pero casi siempre desarrollan síntomas durante el periodo neonato (1,5). La infección neonatal por VHS puede permanecer localizada o diseminarse (1,5). La infección localizada puede afectar a una o a varias zonas a la vez. Entre ellas, la piel, los ojos, la boca o el sistema nervioso central. La infección diseminada se manifiesta por neumonitis, hepatitis, coagulopatía intravascular diseminada y encefalitis (1,5). Entre los lactantes con VHS neonatal, aproximadamente la mitad morirá si no se somete a tratamiento, y casi la mitad de los lactantes que sobreviven desarrollarán graves secuelas neurológicas u oculares (3).

Los procedimientos serológicos pueden resultar útiles para el diagnóstico de infecciones primarias por VHS, así como para determinar evidencias de infecciones anteriores por VHS. El diagnóstico de la infección primaria se lleva a cabo mediante la demostración de la seroconversión o de un aumento significativo en títulos entre sueros comparados de pacientes agudos y convalescientes (2,4). Los procedimientos serológicos no son tan útiles cuando se trata de diagnosticar una infección recurrente por VHS, ya que sucede con frecuencia que las infecciones recurrentes no se reflejan en un cambio en niveles de anticuerpos (2,4). Además, entre las personas que sufren una infección por VHS-2 por primera vez y ya experimentaron una infección por VHS-1 anteriormente en la infancia, es posible que el incremento en anticuerpos específicos anti-VHS-2 sea reducido o no llegue a producirse (2-4). Se han diseñado varios procedimientos serológicos para la detección de anticuerpos anti-VHS. Entre dichos procedimientos se incluye la fijación del complemento, la inmunofluorescencia indirecta, la neutralización en placa y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (2, 4 y 6). Engvall y Perlman fueron los primeros en describir el procedimiento ELISA, y desde entonces se ha utilizado en la detección de una amplia variedad de diferentes antígenos y anticuerpos (10, 11 y 12). En comparación con otras pruebas serológicas, la prueba ELISA puede ser un método muy específico, sensible y fiable para detectar anticuerpos contra el VHS (6, 13 y 14). El procedimiento ELISA permite hacer una determinación objetiva del estado de los anticuerpos en una sola dilución de la muestra en prueba y es adecuado para investigar números grandes de muestras de pacientes.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas ELISA HSV-2 IgG de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de tipo IgG contra VHS-2 en suero humano. La creación de los pocillos sensibilizados de las tirillas de micropocillos de plástico se llevó a cabo mediante adsorción pasiva con antígeno del VHS-2. El procedimiento de la prueba comprende tres pasos de incubación:

1. Los sueros de la prueba (debidamente diluidos) se incuban en micropocillos revestidos de antígeno. Los anticuerpos contra antígeno específico que existan en la muestra se fijarán al antígeno inmovilizado. La placa se lava para eliminar el anticuerpo no fijado y otros componentes séricos.
2. Se agrega anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa a los pocillos y se incuba la placa. El conjugado reaccionará con el anticuerpo de tipo IgG inmovilizado en la fase sólida del paso 1. Se lavan los micropocillos para eliminar el conjugado que no haya reaccionado.
3. Los micropocillos que contienen conjugado de peroxidasa inmovilizado se incuban con solución de sustrato de peroxidasa. La hidrólisis del sustrato por la peroxidasa produce un cambio de color. Transcurrido un tiempo, se detiene la reacción y se mide fotométricamente la intensidad del color de la solución. La intensidad del color de la solución depende de la concentración de anticuerpos en la muestra original analizada.

COMPONENTES DEL SISTEMA DE PRUEBAS

Materiales suministrados:

Cada sistema de pruebas contiene los siguientes componentes en cantidad suficiente para realizar el número de pruebas indicado en la etiqueta del envase. **NOTA: los siguientes componentes contienen como conservante azida de sodio a una concentración de <0,1% (p/v): controles, calibrador y SAVE Diluent®.**

PLATE	1.	Placa: 96 micropocillos distribuidos en doce tirillas de 1x8 micropocillos recubiertos con el antígeno del VHS-2 (cepa G) desactivado. Las tirillas se suministran envasadas en un soporte y selladas en un sobre con desecante.	
CONJ	2.	Conjugado: anti-IgG humana (específica de la cadena Fc) de cabra conjugada con peroxidasa de rábano. Un vial de 15 ml con tapón blanco. Listo para usar.	
CONTROL +	3.	Control positivo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón rojo.	
CAL	4.	Calibrador (suero humano): un vial de 0,5 ml con tapón azul.	
CONTROL -	5.	Control negativo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón verde.	
DIL	SPE	6.	Diluyente SAVe Diluent®: un frasco de 30 ml con tapón verde con Tween 20, albúmina sérica bovina y solución salina tamponada con fosfato. Listo para usar. NOTA: El diluyente SAVe Diluent® cambiará de color cuando se combine con suero.
SOLN	TMB	7.	TMB: un frasco de 15 ml de color ámbar con tapón ámbar que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Listo para usar.
SOLN	STOP	8.	Solución para detener la reacción: un frasco de 15 ml con tapón rojo con H ₂ SO ₄ 1 M y HCl 0,7 M. Listo para usar.
WASHBUF	10X	9.	Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada. Un frasco de 100 ml con tapón transparente que contiene solución salina tamponada con fosfato concentrada 10X y Tween 20 (solución azul). NOTA: la solución 1X tendrá un pH de 7,2 ± 0,2.

NOTAS:

- Los siguientes componentes no dependen del número de lote del sistema de pruebas y se pueden usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS: TMB, solución para detener la reacción y tampón de lavado. El diluyente SAVe Diluent® se puede usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS utilizando el n.º de producto 005CC.
- El sistema de pruebas también contiene una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del sistema de pruebas.

PRECAUCIONES

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Se deben seguir las precauciones normales que se utilizan para manipular reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque asistencia médica. Utilice ropa de protección adecuada, guantes y protección para la cara/ojos. No inhale los vapores. Deshágase de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales.
- Los micropocillos de la placa ELISA no contienen microorganismos viables. No obstante, considere las tirillas **material con potencial riesgo biológico** y manipúlelas de manera acorde.
- Los controles son **material con potencial riesgo biológico**. Los materiales a partir de los cuales se obtuvieron estos productos resultaron negativos para el antígeno del VIH-1, el HBSAg y para anticuerpos contra el VHC y el VIH por métodos de prueba homologados. Sin embargo, dado que ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de que no hay agentes infecciosos, estos productos deberán manipularse con un Nivel de bioseguridad 2, tal como se recomienda para cualquier muestra de sangre o suero humano potencialmente infeccioso en el manual de Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos) de los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de la Salud: última edición; y en la Norma de la OSHA sobre Patógenos que se transmiten en la sangre (19).
- Para lograr resultados precisos, es esencial cumplir estrictamente los tiempos y temperaturas de incubación especificados. **Se debe dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (20-25 °C) antes de comenzar el ensayo.** Los reactivos no utilizados deben devolverse a temperatura de refrigeración inmediatamente después de su uso.
- Un lavado inadecuado podría ocasionar resultados de falsos positivos o falsos negativos. Debe reducirse al mínimo la cantidad de solución de lavado residual (p. ej., mediante secado o aspiración) antes de añadir el conjugado o el sustrato. No permita que los pocillos se sequen entre una incubación y la siguiente.
- El diluyente SAVe Diluent®, los controles, y el calibrador contienen azida sódica en una concentración de <0,1% (p/v). Se ha descrito la formación de azidas de plomo o cobre a partir de la azida de sodio en tuberías de laboratorio, lo cual puede causar explosiones al martillar las tuberías. Para evitarlo, enjuague bien el lavabo con agua después de eliminar las soluciones que contengan azida de sodio.
- La solución para detener la reacción es **TÓXICA** por inhalación, por contacto con la piel o en caso de ingestión. Provoca quemaduras. En caso de accidente o si se siente mal, solicite asistencia médica inmediatamente.
- La solución de TMB es **NOCIVA**. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
- La solución concentrada del tampón de lavado es **IRRITANTE**. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
- Limpie el fondo de la placa de todo residuo de líquido o huellas de los dedos que puedan alterar las lecturas de la densidad óptica (DO).
- La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
- No utilice reactivos de otro origen o fabricante.
- La solución de TMB debe ser incolora o de color amarillo muy claro, verde muy claro o azul muy claro al utilizarla. La contaminación de TMB con el conjugado u otros oxidantes hará que la solución cambie de color prematuramente. No utilice la solución de TMB si tiene un color azul intenso.
- Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
- La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría ocasionar resultados erróneos.
- Los instrumentos de vidrio reutilizables se deben lavar y enjuagar cuidadosamente para eliminar cualquier residuo de detergente.
- Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles.
- No esponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
- Permita que las tirillas de micropocillos y su soporte alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el sobre protector, a fin de evitar la condensación en los micropocillos.
- Recoja la solución de lavado en un lavabo de eliminación. Trate la solución de desecho con desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio) Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
- Precaución: neutralice cualquier desecho líquido con pH ácido antes de agregarlo a la solución de lejía.
- No utilice la placa ELISA si la tirilla indicadora del sobre de desecante ha cambiado de azul a rosado.
- No permita que el conjugado entre en contacto con recipientes o instrumentos que hayan podido contener previamente una solución que utilice azida de sodio como conservante. Los residuos de azida de sodio pueden destruir la actividad enzimática del conjugado.
- No esponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía o a ningún olor fuerte de soluciones que contengan lejía. Los restos de lejía (hipoclorito de sodio), incluso a nivel de trazas, pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos incluidos en este sistema de pruebas.

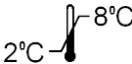
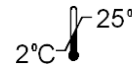
MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Lector de micropocillos ELISA capaz de leer a una longitud de onda de 450 nm. **NOTA: Se podrá usar un lector de longitud de onda única (450 nm) o doble**

(450/620 - 650 nm). Es preferible la longitud de onda doble, puesto que el filtro de referencia adicional está configurado para disminuir posibles interferencias derivadas de anomalías capaces de absorber luz.

- Pipetas capaces de dispensar con exactitud entre 10 y 200 µl.
- Pipeta multicanal capaz de dispensar con exactitud entre 50 y 200 µl.
- Depósitos de reactivos para pipetas multicanal.
- Frasco de lavado o sistema de lavado de micropocillos.
- Agua destilada o desionizada.
- Probeta graduada de un litro.
- Pipetas serológicas.
- Puntas de pipeta desechables.
- Toallas de papel.
- Cronómetro de laboratorio para controlar las etapas de incubación.
- Recipiente para desechos y desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio)

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

	Tirillas de micropocillos revestidos: vuelva a sellar inmediatamente las tirillas sobrantes con el secante y devuélvalas al lugar adecuado de almacenamiento. Una vez abiertas, las tirillas son estables durante 60 días siempre y cuando las tirillas indicadoras del envase del desecante permanezcan de color azul.
	Conjugado: NO CONGELAR.
Sistema de pruebas, calibrador, control positivo, control negativo, TMB y diluyente SAVE Diluent® sin abrir	
	Solución para detener la reacción: 2 - 25°C
	Tampón de lavado (1X): hasta 7 días entre 20 y 25 °C o durante 30 días entre 2 y 8 °C.
	Tampón de lavado (10X): 2 - 25°C

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

- ZEUS Scientific recomienda que el usuario realice la recolección de muestras conforme al documento M29 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI): Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease (Protección de los trabajadores de laboratorio frente a las enfermedades infecciosas).
- Ningún método de prueba puede ofrecer una garantía completa de que las muestras de sangre humana no transmitirán infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos.
- Con este ensayo solamente deben utilizarse sueros recién extraídos y debidamente refrigerados que se hayan obtenido mediante procedimientos homologados de venopunción aséptica (15, 16). No los utilice si se han agregado anticoagulantes o conservantes. Evite utilizar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados con bacterias.
- Almacene la muestra a temperatura ambiente durante un lapso no superior a las 8 horas. Si la prueba no se realiza dentro de las 8 horas, el suero puede almacenarse a entre 2 - 8° C, durante un lapso no superior a las 48 horas. Si tiene previsto retrasar la realización de la prueba, conserve los sueros de la prueba a -20 °C o a temperaturas inferiores. Evite múltiples ciclos de congelación/descongelación que puedan ocasionar la pérdida de actividad de los anticuerpos y dar lugar a resultados erróneos. Es responsabilidad del laboratorio individual usar todas las referencias disponibles o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad para su laboratorio (20).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Retire los componentes individuales del kit del almacenamiento y permita que alcancen la temperatura ambiente (20 - 25 °C).
- Determine el número de micropocillos necesarios. Calcule seis determinaciones de control o calibrador (un blanco de reactivo, un control negativo, tres calibradores y un control positivo) por serie. En cada prueba se debe analizar un blanco de reactivo. Compruebe que las configuraciones de controles y calibrador sean correctas en los requisitos del programa y del lector. Devuelva las tirillas no usadas a la bolsa resellable con desecante, séllela y devuélvala a su almacenamiento entre 2 y 8 °C.

EJEMPLO DE CONFIGURACIÓN DE LA PLACA		
	1	2
A	Blanco	Paciente 3
B	Control negativo	Paciente 4
C	Calibrador	etc.
D	Calibrador	
E	Calibrador	
F	Control positivo	
G	Paciente 1	
H	Paciente 2	

- Prepare una dilución 1:21 (por ejemplo: 10 µl de suero + 200 µl de diluyente SAVE Diluent®) del control negativo, del calibrador, del control positivo y de cada suero de paciente. **NOTA: el diluyente SAVE Diluent® sufrirá un cambio de color, lo cual confirma que la muestra se ha combinado con el diluyente.**
- A cada micropocillo se añaden 100 µl de cada control diluido, calibrador y muestra de paciente. Compruebe que las muestras estén bien mezcladas. Utilice una punta de pipeta diferente para cada muestra.
- Añada 100 µl de diluyente SAVE Diluent® al micropocillo A1 como blanco de reactivo. Compruebe que la configuración del micropocillo del blanco de reactivo sea correcta en los requisitos del programa y del lector.
- Incuba la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
- Lave las tirillas de micropocillos 5 veces.
 - Procedimiento de lavado manual:**
 - Agite la placa para eliminar el líquido de todos los micropocillos.
 - Llene cada micropocillo con solución tampón de lavado. Asegúrese de que no queden burbujas de aire atrapadas en los micropocillos.
 - Repita los pasos 1. y 2. para un total de 5 lavados.
 - Agite la placa para eliminar la solución de lavado de todos los micropocillos. Invierta la placa sobre una toalla de papel y dele unos golpes secos para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos. Inspeccione visualmente la placa para asegurarse de que no queden residuos de la solución de lavado. Recoja la solución de lavado en un recipiente desechable y trátela con desinfectante al final de la jornada de trabajo.
 - Procedimiento de lavado automático:**
Si está utilizando un sistema automático de lavado, ajuste el volumen dispensado en 300-350 µl/micropocillo. Ajuste el ciclo de lavado para 5 lavados, sin interrupción entre los mismos. En caso necesario, se puede extraer la placa de micropocillos del lavador, invertirla sobre una toalla de papel y golpearla con firmeza para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos.
- Agregue 100 µl de conjugado a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
- Incuba la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.

10. Lave los micropocillos siguiendo el procedimiento descrito en el paso 7.
11. Agregue 100 µl de TMB a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
12. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) entre 10 y 15 minutos.
13. Detenga la reacción añadiendo 50 µl de la solución para detener la reacción a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregó la TMB. Las muestras positivas cambiarán de azul a amarillo. Después de agregar la solución para detener la reacción, dé unos cuantos golpes secos a la placa para asegurarse de que las muestras estén bien mezcladas.
14. Ajuste la longitud de onda del lector de micropocillos a 450 nm y mida la densidad óptica (DO) de cada micropocillo con respecto al blanco de reactivo. Lea la placa en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución para detener la reacción.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA ABREVIADO

1. Diluya el suero 1:21.
2. Añada la muestra diluida al micropocillo - 100 µl/micropocillo.
3. $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ Incube durante 25 ± 5 minutos.
4. Lave.
5. Añada el conjugado - 100 µl/micropocillo.
6. $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ Incube durante 25 ± 5 minutos.
7. Lave.
8. Añada la TMB - 100 µl/micropocillo.
9. $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ Incube durante 10 - 15 minutos.
10. Añada la solución para detener la reacción - 50 µl/micropocillo - Mezcle.
11. LEA en el transcurso de 30 minutos.

CONTROL DE CALIDAD

1. El calibrador se debe analizar por triplicado cada vez que se realiza esta prueba. También se deben incluir un blanco de reactivo, el control negativo y el control positivo.
2. Calcule la media de los micropocillos de los tres calibradores. Si alguno de los tres valores difiere de la media más del 15%, deséchelo y calcule la media de los dos valores restantes.
3. El valor medio de la DO del calibrador, del control negativo y del control positivo deben quedar dentro de los intervalos siguientes:

	<u>Intervalo de DO</u>
Control negativo	≤ 0,250
Calibrador	≥ 0,300
Control positivo	≥ 0,500

- a. El valor de la DO para el control negativo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≤ 0,9.
- b. El valor de la DO para el control positivo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≥ 1,25.
- c. Si no se cumplen las condiciones anteriores, la prueba no se debe considerar válida y se debe repetir.
4. Los controles negativo y positivo sirven para verificar fallos sustanciales de los reactivos, pero no aseguran la precisión en el límite de referencia de la prueba.
5. Es posible analizar controles adicionales siguiendo las directrices o los requisitos de las normativas locales, regionales o nacionales, o de las organizaciones acreditadas.
6. Consulte el documento C24 del CLSI: Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures (Control de calidad estadístico para procedimientos de determinación cuantitativa) para obtener información sobre las prácticas de control de calidad apropiadas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Cálculos

- a. *Factor de corrección:* El fabricante ha determinado un valor de DO como límite de referencia para las muestras positivas y lo ha correlacionado con el calibrador. El factor de corrección (FC) permite calcular el límite de referencia de las muestras positivas. Asimismo, permite corregir las pequeñas variaciones cotidianas de los resultados de las pruebas. El factor de corrección se determina para cada lote de componentes del kit y está impreso en la etiqueta de componentes que se encuentra en la caja del sistema de pruebas.
- b. *Límite de referencia de la DO:* Para obtener el límite de referencia de la DO, multiplique el FC por la media de la DO del calibrador determinado anteriormente.
(FC x media de DO del calibrador = límite de referencia de la DO)
- c. *Valores índice/cocientes de DO:* Calcule el valor índice/cociente de DO de cada muestra dividiendo su valor de DO por el límite de referencia de la DO del paso 2.

Ejemplo:	DO media del calibrador	=	0,793
	Factor de corrección (FC)	=	0,25
	Límite de referencia de la DO	=	0,793 x 0,25 = 0,198
	DO de muestra desconocida	=	0,432
	Valor índice/cociente de DO de la muestra	=	0,432/0,198 = 2,18

2. **Interpretaciones:** Los valores índice/cocientes de DO se interpretan como se indica a continuación:

	<u>Valor índice/cociente de DO</u>
Muestras negativas	≤0,90
Muestras dudosas	0,91 a 1,09
Muestras positivas	≥1,10

- a. El VHS-1 y el VHS-2 comparten muchos antígenos con reactividad cruzada. Por este motivo, para evaluar completamente el estado de los anticuerpos tipo IgG anti-VHS, todas las muestras se deberán analizar simultáneamente con las pruebas ELISA HSV-1 y HSV-2. Compare y evalúe los resultados de las dos pruebas de la manera siguiente:

Positivo (≥1,10)	Dudoso (0,91-1,09)	Negativo (< 0,90)	Interpretación
VHS-1, VHS-2 VHS-1 VHS-2 VHS-1 VHS-2	VHS-2 VHS-1	VHS-2 VHS-1	Positivo para el anticuerpo IgG contra el VHS. Indica una infección actual o anterior por VHS-1, VHS-2 o ambos virus.
	VHS-1, VHS-2 VHS-1 VHS-2	VHS-2 VHS-1	Dudoso. Las muestras deberán volver a analizarse. Consulte la nota (b) a continuación.
		VHS-1, VHS-2	Negativo para el anticuerpo IgG contra el VHS. Indica que no hay infección actual o anterior por VHS-1 o VHS-2. Consulte la nota a continuación.

- Vuelva a analizar por duplicado las muestras con valores del coeficiente de DO comprendidos en el intervalo dudoso (0,91 – 1,09). Documente cualesquiera dos de los tres resultados que concuerden. Repita la prueba de las muestras dudosas utilizando un procedimiento serológico alternativo y/o repita la evaluación extrayendo otra muestra entre una y tres semanas más tarde.
- Las muestras obtenidas demasiado temprano durante una infección primaria pueden no tener niveles detectables de anticuerpos IgG. Si se sospecha de la existencia de una infección primaria, obtenga otra muestra transcurridos 8-14 días para someterla a prueba en el mismo ensayo junto con la muestra original, a fin de determinar la seroconversión.
- Para evaluar la seroconversión de los sueros por pares (suero de paciente agudo y suero de convaleciente), deberá utilizar el mismo ensayo para realizar las pruebas. Si las muestras de paciente agudo son negativas y las del convaleciente son positivas en anticuerpos tipo IgG anti-VHS-1 o anti-VHS-2 (o positivas en ambos virus), se ha producido la seroconversión y se indica la existencia de una infección primaria por VHS.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

- El VHS-1 y VHS-2 comparten muchos antígenos de reacción cruzada y una mayoría del anticuerpo producido en respuesta a una infección inicial se dirige contra antígenos compartidos (17). Es probable que la infección inicial por el VHS-2 en personas con infección previa por VHS-1 produzca un incremento significativo del título de anticuerpos frente a los antígenos comunes, así como frente a los antígenos específicos del VHS-2.
- Los resultados de las pruebas de anticuerpos anti-VHS-1 y anti-VHS-2 no indican el lugar de la infección. Esta prueba no está diseñada para sustituir al aislamiento viral.
- La presencia de anticuerpos IgG frente a VHS-1 o VHS-2 no implica necesariamente la protección frente a infecciones futuras por VHS-1 (17). Sin embargo, las personas con una infección pasada por el VHS-1 que después se infectan por el VHS-2 pueden tener una evolución clínica menos grave (17).
- No use el cociente de DO de una sola muestra de suero para determinar una infección reciente. Para demostrar la seroconversión será necesario recolectar y analizar simultáneamente muestras por pares (de paciente agudo y de convaleciente).
- Interprete los resultados de la prueba para demostrar la seroconversión de forma conjunta con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos de diagnóstico.
- Las muestras que contienen anticuerpos contra antígenos nucleares (como los que se encuentran en pacientes con lupus eritematoso sistémico) pueden producir resultados positivos falsos en los sistemas de pruebas ELISA HSV-1 y HSV-2 de ZEUS.
- Las muestras que se recolecten demasiado temprano en la evolución de una infección pueden no tener niveles detectables de IgG. En tales casos, tome una segunda muestra transcurridas de dos a siete semanas y analícela simultáneamente con la muestra original para detectar la seroconversión.
- Interprete con precaución un resultado positivo en pruebas de IgG anti-VHS en neonatos, ya que los anticuerpos maternos adquiridos de forma pasiva pueden persistir hasta 6 meses. Una prueba de anticuerpos IgG negativa en el neonato puede ayudar a excluir una infección congénita (18). El diagnóstico más definitivo de la infección activa por VHS requiere el aislamiento viral.
- Los sistemas de pruebas ELISA HSV-1 y HSV-2 de ZEUS no están diseñados para su utilización en el diagnóstico de infecciones actuales en embarazadas. Determine la existencia de infecciones actuales en embarazadas mediante aislamiento viral (4).
- Los resultados de esta prueba son cualitativos. Considere los resultados como positivos o negativos en lo que respecta a la presencia de anticuerpos de tipo IgG anti-VHS. Esta prueba solamente puede detectar la seroconversión (el suero del paciente agudo ofrece un resultado negativo y el suero del convaleciente da un resultado positivo). No se han establecido criterios para un aumento significativo del título.

RESULTADOS ESPERADOS

La incidencia de infección por VHS varía con la edad, el lugar geográfico, la conducta sexual y el estado socioeconómico (2). En los Estados Unidos, del 30 al 90% de las personas tienen anticuerpos positivos frente al VHS después de su primera década de vida (7,8).

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

1. Estudios comparativos

El sistema de pruebas ELISA HSV-2 IgG de ZEUS se ha comparado con otros procedimientos ELISA para la detección de anticuerpos de tipo IgG anti-VHS-2 utilizando un total de 132 muestras de suero procedentes de donantes de sangre normales en el nordeste de Estados Unidos. Estos resultados se resumen a continuación:

Sistema de pruebas		ELISA HSV-2 IgG de referencia		
		Positivo	Negativo	Dudoso*
ELISA HSV-2 IgG de ZEUS	Positivo	88	0	3
	Negativo	1	36	1
	Dudoso*	1	2	0
Especificidad = 100% (36/36)		* Los resultados dudosos no se han incluido en los cálculos de sensibilidad y especificidad.		
Sensibilidad = 98,8% (88/89)				

2. Precisión y reproducibilidad:

Se llevaron a cabo estudios de reproducibilidad con objeto de evaluar la precisión intraensayo e interensayos del sistema de pruebas ELISA HSV-2 IgG de ZEUS. Técnicos realizaron las pruebas en cuatro muestras de suero que tenían un cociente de DO dentro de los intervalos positivo alto, positivo medio, positivo bajo y negativo. Se repitieron 8 pruebas de cada muestra en tres días consecutivos. Se calculó el cociente medio de DO y el coeficiente de variación (CV) de cada muestra. Estos datos se resumen a continuación:

Suero	Intraensayo (n=8)						Interensayos (n=3)	
	Serie 1		Serie 2		Serie 3		Cociente medio	% CV
	Cociente medio	% CV	Cociente medio	% CV	Cociente medio	% CV		
1	4,37	9,0	3,94	6,6	4,74	5,9	4,35	7,4
2	2,30	6,2	2,08	7,5	2,32	7,0	2,32	4,8
3	1,65	7,6	1,29	9,8	1,39	12,7	1,44	15,2
4	0,65	10,6	0,55	9,7	0,60	10,6	0,60	6,3

3. Reactividad cruzada

Se analizaron veintiuna muestras negativas en el sistema de pruebas ELISA HSV-2 IgG de ZEUS mediante el ensayo de inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos de tipo IgG específicos del virus Varicela zoster (VZ), el antígeno de la cápside viral del virus Epstein-Barr (ACV-VEB) y el citomegalovirus (CMV). Doce de las muestras fueron positivas para CMV, 10 fueron positivas para VZ, y la totalidad de las 21 fueron positivas para ACV. Estos resultados demuestran que los sistemas de pruebas HSV-1 y HSV-2 ELISA de Zeus no tienen reactividad cruzada con los anticuerpos contra otros virus del herpes.

REFERENCIAS

- Nahmias AJ, and Roizman BR: Infection with Herpes Simplex viruses 1 and 2. New Eng. J. Med. 289:667, 719, 781, 1983.
- Lycke E, and Jeansson S: Herpesviridae: Herpes Simplex virus. In: EH Lennett, P Halonen, and FA Murphy, eds., Laboratory Diagnosis of Infectious diseases: Principals and Practice, vol. II: Viral, rickettsial and Chlamydial Diseases, Springer-Verlag, Berlin, pp 211, 1988.

3. Nahmias AJ, Dannenbarger J, Wickliffe C, and Muther J: Clinical aspects of infection with Herpes simplex viruses I and II. In: AJ Nahmias, WR Dowdle, and RF Schinzel, eds., *The Human Herpes Viruses, an Interdisciplinary Perspective*, Elsevier/North-Holland Publishing co., New York, pp 2, 1980.
4. Drew WL and Rawls WE: Herpes Simplex viruses, In: EH Lennette, A Balows, WJ Hausler, and HJ Shadomy, eds., *Manual of Clinical Microbiology*, 4th ed., American Society for Microbiology, Washington, DC pp 705, 1985.
5. Whitley RJ and Hutto C: Neonatal Herpes Simplex virus infections. *Ped. Rev.* 7:119, 1985.
6. Denoyel GA, Gaspar A, and Novyrigat C: Enzyme immunoassay for measurement of antibodies to Herpes Simplex virus infection: Comparison and complement fixation, immunofluorescent antibody, and neutralization techniques. *J. Clin. Micro.* 11:114-119, 1980.
7. Nahmias AJ, Josey WE, Naib AZ, Luce CF, and Duffey A: Antibodies to Herpes virus hominis types 1 and 2 in humans. I. Patients with genital herpes 2 infections. *Am. J. Epidem.* 91:539, 1970.
8. Rawls WE, Gardner HL, Flanders RW, Lowry SP, Kaufman RH, and Melnick JL: Genital herpes in two social groups. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 110:682, 1971.
9. McClung H, Seth P, and Rawls WE: Relative concentrations in human sera of antibodies to cross-reacting and specific antigens of Herpes Simplex virus types 1 and 2. *Am. J. Epidem.* 104:192, 1976.
10. Engvall E, and Perlman P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* 8:874, 1971.
11. Engvall E and Perlman P: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.* 109:129, 1972.
12. Voller A, Bartlett A, and Bidwell DE: Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Path.* 31:507, 1978.
13. Cremer NE, Cossen CK, Hanen CV, and Shell GR: Evaluation and reporting of enzyme immunoassay determinations of antibody to Herpes Simplex virus in sera and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Micro.* 15:815, 1982.
14. Gilman SC and Docherty JJ: Detection of antibodies specific for Herpes Simplex virus in human sera enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Infect. Dis.* 136:5286, 1977.
15. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens: NCCLS Procedure H18. Approved guideline.
16. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: NCCLS Procedure H3, Approved Standard.
17. Stewart JA and Herrman KL: Herpes Simplex Virus. In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 3rd ed., NR Rose, H Friedman, and JL Fahey, eds., American Society for Microbiology, Washington, DC, Ch. 75, pp 497-501, 1986.
18. Chernesky MA, Ray CG, and Smith TF: Laboratory diagnosis of viral infections. *Cumitech 15*, American Society for Microbiology, Washington, DC.
19. U.S. Department of Labor (OSHA): Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens. Final Rule. 21CFR 1910.1030.
20. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific, Inc.
 200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
 Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Opción 2
 International: +1 908-526-3744
 Fax: +1 908-526-2058
 Website: www.zeusscientific.com
 ZEUS ELISA y SAVE Diluent* son marcas registradas de ZEUS Scientific, Inc.

Para Asistencia al cliente en EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.
 Para Asistencia técnica en EE. UU., comuníquese con ZEUS Scientific: llame al número gratuito o escriba un e-mail support@zeusscientific.com.
 Para consultas a Asistencia al cliente y Asistencia técnica fuera de EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.
 ©2018 ZEUS Scientific, Inc. Todos los derechos reservados.

