

VERWENDUNGSZWECK

Das Herpes1 und/oder -2 IgM-ZEUS-ELISA-Testsystem ist ein Enzymimmunoassays (ELISA) zum qualitativen Nachweis von IgM-Antikörpern gegen das Herpes simplex-Virus (HSV) in Humanserum. Das Testsystem dient zur Beurteilung serologischer Anzeichen einer primären oder reaktivierten HSV-Infektion und ist zur *In-vitro*-Diagnostik vorgesehen.

HINTERGRUND

HSV-Infektionen werden entweder als primär oder rezidivierend eingestuft. Nach der Primärinfektion wird in den sensorischen Neuronen eine latente Infektion etabliert und Rezidive werden durch Reaktivierung der latenten Infektion verursacht.² Rezidive verlaufen in der Regel leichter und kürzer als die Primärinfektion.¹ HSV-Infektionen sind normalerweise im Bereich der Primärinfektion lokalisiert. Bei immungeschwächten Patienten können jedoch schwere lokale oder disseminierte Infektionen auftreten. Zu diesem Personenkreis gehören Neugeborene sowie Patienten unter immunsuppressiver Therapie, wie z.B. Transplantatempfänger und Krebspatienten.^{1,2}

HSV-Infektionen werden über virushaltige Sekrete durch engen körperlichen Kontakt übertragen. Sowohl primäre als auch rezidivierende HSV-Infektionen verlaufen oftmals subklinisch oder inapparent. Virusausscheidung ist der wichtigste Faktor, der zur Verbreitung des Virus beiträgt.² Zwischen 75 und 90 % der Bevölkerung mit niedrigerem sozioökonomischen Status haben am Ende des ersten Lebensjahrzehnts HSV-Antikörper gebildet.^{5,7} Etwa 30 bis 40 % der Bevölkerung mit höherem sozioökonomischen Status werden in der Mitte des zweiten Lebensjahrzehnts seropositiv.⁵

Primäre HSV-1-Infektionen der oralen Mukosa finden in der Regel bei Kindern unter dem Alter von 5 Jahren statt.² Die meisten Infektionen verlaufen inapparent. Apparente Infektionen sind durch Gingivo-Stomatitis mit Fieber, Müdigkeit und schmerzhaft geschwollenen Lymphknoten charakterisiert.² Auf der oralen Mukosa bilden sich zahlreiche kleine Bläschen, die ulzerieren und innerhalb von etwa zwei Wochen abheilen. Die häufigste Form einer rezidivierenden HSV-1-Infektion ist der Herpes labialis, bei dem die Bläschen auf den Lippen, am Naseneingang oder auf der Haut im Mundbereich erscheinen.^{1,2} Die Symptome genitaler HSV-Infektionen umfassen ulzerative Läsionen mit Schmerzen, Fieber, Dysurie und Lymphadenopathie.⁶

Die gravierendste Komplikation einer genitalen HSV-Infektion ist der neonatale Herpes.² Im Gegensatz zum Zytomegalievirus durchdringt HSV nur in seltenen Fällen die Plazenta und infiziert den Fötus *in utero*.¹ HSV wird bei der Geburt von der infizierten Mutter auf das Neugeborene übertragen.¹ Die Übertragung findet beim Durchgang durch den infizierten Geburtskanal statt oder wenn die Fruchtblase seit mehr als sechs Stunden gesprungen ist.⁶ Bei Müttern mit einer aktiven Primärinfektion beträgt das Risiko einer Übertragung an den Säugling bis zu 40 %.⁵ Etwa 69-80% der Säuglinge mit neonatalem Herpes werden von Müttern geboren, die bei der Geburt keine Symptome einer genitalen HSV-Infektion aufgewiesen haben.⁵

Mit HSV infizierte Säuglinge erscheinen bei der Geburt unauffällig, entwickeln jedoch fast immer Symptome während der Neugeborenenphase.^{1,5} Neonatale HSV-Infektionen können lokalisiert bleiben oder disseminieren.^{1,5} Lokalisierte Infektionen können eine oder mehrere Körperregionen betreffen. Dazu gehören Haut, Augen, Mund und Zentralnervensystem. Disseminierte Infektionen manifestieren sich als Pneumonitis, Hepatitis, disseminierte intravasale Gerinnung und Enzephalitis.^{1,5} Etwa die Hälfte der unbehandelten Säuglinge mit neonatalem Herpes sterben und etwa die Hälfte der überlebenden Säuglinge entwickeln schwerwiegende neurologische Störungen oder Folgeerkrankungen der Augen.³

Serologische Verfahren können zur Diagnose einer Primärinfektion und zur Beurteilung von Anzeichen einer zurückliegenden HSV-Infektion herangezogen werden. Die Diagnose einer Primärinfektion beruht auf dem Nachweis einer Serokonversion oder einem signifikanten Titeranstieg zwischen Serumpaaren (Akut- und Rekonvaleszentenseren).^{2,4} Serologische Verfahren eignen sich weniger zur Diagnose von Rezidiven, da diese oftmals nicht zu einem Anstieg der Antikörperkonzentration führen.^{2,4} Außerdem ist bei Personen mit einer HSV-2-Primärinfektion, die in der Kindheit eine HSV-1-Infektion durchgemacht haben, nur ein geringer oder kein Anstieg von HSV-2-spezifischen Antikörpern zu verzeichnen.^{2,4}

Zum Nachweis von Antikörpern gegen HSV wurden zahlreiche serologische Methoden entwickelt. Dazu gehören die Komplementbindungsreaktion, der indirekte Immunfluoreszenztest, der Neutralisationstest und der ELISA (Enzymimmunoassay).^{2,4,6} Die ELISA-Methode wurde erstmals von Engvall und Perlman beschrieben und wird seither für den Nachweis vieler verschiedener Antigene und Antikörper eingesetzt.¹⁰⁻¹² Beim Vergleich mit anderen serologischen Tests zeigt sich der ELISA als eine sehr spezifische, empfindliche und zuverlässige Methode zum Nachweis von Antikörpern gegen HSV.^{6,13,14} Die ELISA-Methode ermöglicht eine objektive Bestimmung des Antikörperstatus anhand einer einzigen Probenverdünnung und ist daher für das Testen großer Probenaufkommen geeignet.

In einer Probe vorhandene hochaffinitive IgG-Antikörper gegen HSV können den Nachweis spezifischer IgM-Antikörper beeinträchtigen.^{15, 20} Hochaffinitive IgG-Antikörper können vorzugsweise an HSV-Antigene binden und zu falsch-negativen IgM-Ergebnissen führen.¹⁵ Außerdem kann Rheumafaktor, falls zusammen mit antigenspezifischen IgG vorhanden, an das IgG binden und falsch-positive IgM-Ergebnisse verursachen.¹⁶ Beide Probleme können gelöst werden, indem IgG vor dem IgM-Nachweis aus der Probe entfernt wird.¹⁶ Beide Probleme können gelöst werden, indem IgG vor dem IgM-Nachweis aus der Probe entfernt wird.¹⁷⁻²⁰ Zur Abtrennung von IgG werden verschiedene Methoden angewendet. Diese Methoden umfassen Gelfiltration¹⁷, Adsorption mit Protein A¹⁸, Ionenaustauschchromatographie¹⁹ und die Präzipitation von IgG mit Antihuman-IgG-Serum.²⁰

PRINZIP DES TESTS

Das HSV-1/HSV-2 IgM-ZEUS-ELISA-Testsystem dient bestimmungsgemäß zum Nachweis von Antikörpern der Klasse(n) IgM zum HSV in humanen Sera. Die Probenfelder auf Kunststoffstreifen wurden durch passive Adsorption mit HSV-Antigen erstellt. Das Testverfahren umfasst drei Inkubationsschritte:

1. Die Testsera werden in dem mitgelieferten Probenverdünner verdünnt. Der Probenverdünner enthält anti-humanes IgG, das ausfällt und IgG und Rheumatoid-Faktor aus der Probe entfernt, sodass IgM frei wird, um mit dem immobilisierten Antigen zu reagieren. Bei der Probeinkubation binden sich die Antigen-spezifischen IgM-Antikörper in der Probe an das immobilisierte Antigen. Die Platte wird gewaschen, um ungebundene Antikörper und andere Serumkomponenten zu entfernen.
2. Mit Peroxidase konjugiertes anti-humanes-IgM wird in die Felder gegeben und die Platte wird inkubiert. Das Konjugat reagiert mit dem IgM-Antikörper, der auf der soliden Phase in Schritt 1 immobilisiert wurde. Die Felder werden gewaschen, um nicht reagiertes Konjugat zu entfernen.
3. Die Probenfelder mit dem immobilisierten Peroxidase-Konjugat werden mit Peroxidase-Substratlösung inkubiert. Die Hydrolyse des Substrats durch Peroxidase bewirkt eine Farbänderung. Nach einer bestimmten Zeit wird die Reaktion gestoppt und die Farbintensität der Lösung fotometrisch gemessen. Die Farbintensität der Lösung hängt von der Antikörperkonzentration in der ursprünglichen Testprobe ab.

KOMPONENTEN DES TESTSYSTEMS

Gelieferte Materialien

Jedes Testsystem enthält die folgenden Komponenten in ausreichenden Mengen, um die auf der Verpackung angegebene Anzahl von Tests durchzuführen. **HINWEIS: Folgende Komponenten enthalten <0,1 % (Gtrmm-Vol.-%) Natriumazid als Konservierungsmittel): Kontrollflüssigkeiten, Kalibrierer und Probenverdünner.**

PLATE	<p>Platte: Jede Platte ist für 96 Bestimmungen vorgesehen. (12x1x8 Probenfelder); Mikrotiterstreifen, die mit inaktiviertem HSV-1-Antigen (MacIntyre-1. Stamm) und HSV-2-Antigen (Stamm G aus E6, Reinheit ~20 %) beschichtet sind. Die Streifen befinden sich in einem Streifenhalter und sind in Umschlägen mit einem Trockenmittel versiegelt und in Plastikbeuteln verpackt.</p>
CONJ	<p>2. Konjugat: Konjugiertes (Meerrettich-Peroxidase) anti-humanes IgM (Ziege, γ-kettenspezifisch). Ein (1) 15 ml-Fläschchen mit weißem Deckel. Gebrauchsfertig.</p>

CONTROL	+
CAL	
CONTROL	-
DIL	SPE
SOLN	TMB
SOLN	STOP
WASHBUF	10X

3. Positiv-Kontrollflüssigkeit (humanes Serum). Ein (1) 0,35 ml-Fläschchen mit rotem Deckel.
4. Kalibrierer (humanes Serum). Ein (1) 0,5 ml-Fläschchen mit blauem Deckel.
5. Negativ-Kontrollflüssigkeit (humanes Serum). Ein (1) 0,35 ml-Fläschchen mit grünem Deckel.
6. Probenverdünner: Eine (1) 30 ml-Flasche (grünem Deckel) mit Tween-20, bovinem Serumalbumin und Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung. Violette Lösung. Gebrauchsfertig.
7. TMB: Eine (1) orange 15 ml-Flasche (oranger Deckel) mit 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin. Gebrauchsfertig.
8. Stopplösung: Eine (1) 15 ml-Flasche (roter Deckel) mit 1M H₂SO₄, 0,7M HCl. Gebrauchsfertig.
Waschpufferkonzentrat (10X): 1 Teil Konzentrat mit 9 Teilen deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen. Eine (1) 100 ml-Flasche (durchsichtiger Deckel) mit einer 10fach-konzentrierten Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung und Tween-20 Lösung (blaue Lösung). **HINWEIS: Die 1X-Lösung hat einen pH von 7,2 ± 0,2.**

HINWEISE:

1. Die folgenden Komponenten sind nicht Testsystem-Chargennummer-abhängig und können bei jedem ZEUS ELISA Test eingesetzt werden: TMB, Stopplösung und Waschpuffer.
2. Das Testsystem enthält außerdem Komponentendatenetikett mit chargenspezifischer Information in der Testsystem-Box.

VORSICHTSMASSNAHMEN

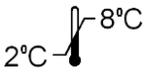
1. Nur zum Gebrauch in *In-vitro*-Diagnosen.
2. Bei der Handhabung von Laborreagenzien normale Vorsichtsmassnahmen einhalten. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Angemessene Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Dämpfe nicht einatmen. Bei der Entsorgung von Abfällen alle örtlichen und nationalen Gesetze befolgen.
3. Die Felder auf der ELISA-Platte enthalten keine lebensfähigen Organismen. Dennoch sollten die Streifen als **potenzielle biologische Gefahrenstoffe** eingestuft und entsprechend behandelt werden.
4. Die Kontrollflüssigkeiten sind **potenzielle biologische Gefahrenstoffe**. Die Quellenmaterialien dieser Produkte wurden mit anerkannten Testmethoden negativ auf HIV-1-Antigen, HBsAg. und auf Antikörper gegen HCV und HIV getestet. Keine Testmethode kann jedoch eine komplette Gewähr dafür liefern, dass keine infektiösen Agenten vorhanden sind, und deshalb sind diese Produkte gemäß Biosicherheitsstufe 2 zu behandeln, wie für alle potenziell infektiösen humanen Serum- oder Blutproben in der aktuellen Ausgabe des Handbuchs „Biosafety in Microbiological und Biomedical Laboratories" der Centers for Disease Control/National Institutes of Health und „Standard for Bloodborne Pathogens"²³ von OSHA empfohlen.
5. Einhalten der angegebenen Inkubationszeit und Temperatur ist entscheidend für akkurate Resultate. **Alle Reagenzien müssen vor dem Test Zimmertemperatur (20–25 °C) annehmen.** Nicht verbrauchte Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder auf Kühlschranktemperatur bringen.
6. Falsches Waschen kann falsche positive bzw. negative Resultate erzeugen. Sicherstellen, dass Waschmittelreste auf ein Minimum reduziert werden (z.B. durch Trocknen mit Papier oder Aspiration), bevor Konjugat oder Substrat zugefügt wird. Die Felder zwischen Inkubationen nicht austrocknen lassen.
7. Das Probenverdünnungsmittel, die Kontrollen, und das Kalibrierer enthalten <0,1 % (Gramm-Vol.-%) Natriumazid(.). Natriumazid bildet Blei- und Kupferazide in Laborabflussrohren, die bei Rohrleitungsschlägen Explosionen verursachen können. Waschbecken nach dem Ausgießen von Natriumazid-haltigen Lösungen gründlich ausspülen, um Explosionen zu verhindern.
8. Die Stopplösung ist bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken GIFTIG und kann Verbrennungen verursachen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort ärztlichen Rat einholen.
9. Die TMB-Lösung ist SCHÄDLICH. Sie ist ein Irritans für Augen, Atmungssystem und Haut.
10. Das Waschpufferkonzentrat ist ein IRRITANS für Augen, Atmungssystem und Haut.
11. Die Unterseite der Platte von Flüssigkeitsrückständen und/oder Fingerabdrücken, die die optische Dichteablesung (OD) stören könnten, sauber wischen.
12. Verdünnung oder Verpanschung der Reagenzien kann falsche Resultate erzeugen.
13. Keine Reagenzien aus anderen Quellen oder von anderen Herstellern verwenden.
14. Die TMB-Lösung sollte bei der Anwendung farblos, sehr hell gelb, sehr hell grün oder sehr hell blau sein. Ein Kontamination der TMB mit Konjugat oder anderen Oxidanzien führt zu einer vorzeitigen Farbänderung der Lösung. Die TMB-Lösung nicht verwenden, wenn sie merklich blau ist.
15. Niemals mit dem Mund pipettieren. Kontakt von Reagenzien und Patientenproben mit der Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
16. Mikrobielle Kontamination von Reagenzien vermeiden. Inkorrekte Resultate sind möglich.
17. Querkontamination von Reagenzien und/oder Proben kann fehlerhafte Ergebnisse erzeugen
18. Wiederverwendbare Glasbehälter müssen gewaschen und gründlich von allen Detergenzien frei gespült werden.
19. Spritzen oder Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
20. Reagenzien in der Aufbewahrung oder bei der Inkubation keinem starken Licht aussetzen.
21. Die Probenfelderstreifen und den Halter auf Zimmertemperatur kommen lassen, bevor der Schutzumschlag geöffnet wird, um die Felder vor Kondensation zu schützen.
22. Die Waschlösung in einem Entsorgungsbassin sammeln. Die verbrauchte Lösung mit einem Desinfizierer (z. B. 10-prozentiger Haushaltsbleiche - 0,5 % Natriumhypochlorit) behandeln. Reagenzien keinen Bleichdämpfen aussetzen.
23. Vorsicht: Flüssigkeitsabfälle mit saurem pH vor Zufügen in die Bleichlösung neutralisieren.
24. Die ELISA Platte nicht verwenden, wenn der Indikatorstreifen auf dem Trockenmittelbeutel nicht blau, sondern rosa ist.
25. Konjugat nicht mit Behältern oder Instrumenten in Kontakt kommen lassen, die vorher eine Lösung mit Natriumazid als Konservierungsmittel enthalten haben könnten. Rückstände von Natriumazid können die Enzymaktivität des Konjugats unterbinden.
26. Die reaktiven Reagenzien keinen Lösungen mit Bleichmittel oder starken Gerüchen von Lösungen mit Bleichmittel aussetzen. Spuren von Bleichmittel (Natriumhypochlorit) können die biologische Aktivität vieler reaktiver Reagenzien in diesem Testsystem unterbinden.

BENÖTIGTE ABER NICHT DELIEFERTERTE MATERIALIEN

1. ELISA-Probenfeldleser mit Lesefähigkeit für eine Wellenlänge von 450 nm. **HINWEIS: Es kann ein Lesegerät für eine (450 nm) oder zwei Wellenlängen (450/620–650 nm) verwendet werden. Zwei Wellenlängen werden bevorzugt, da der zusätzliche Referenzfilter potenzielle Interferenzen aufgrund von anomaler Lichtabsorption verringert.**
2. Pipetten mit Fähigkeit zu präziser Abgabe von 10 bis 200 µl.
3. Multikanal-Pipette mit Fähigkeit zu präziser Abgabe von 50 bis 200 µl.
4. Reagenzreservoirs für Multikanal-Pipetten.
5. Waschflasche oder Probenfeld-Waschsystem.
6. Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
7. Messzylinder, 1 Liter.
8. Serologische Pipetten.
9. Einweg-Pipettenspitzen.

10. Papierhandtücher.
11. Labor-Stoppuhr zur Überwachung der Inkubationsschritte.
12. Entsorgungsbassin und Desinfizierer. 10 % Haushaltsbleichmittel, 0,5% Natriumhypochlorit.)

AUFBEWAHRUNG

	Beschichtete Probenfeldstreifen: Übrige Streifen sofort wieder mit Trockenmittel versiegeln und zur korrekten Aufbewahrung zurückbringen. Nach Öffnen des Umschlags sind die Streifen bis 60 Tage stabil, wenn der Indikatorstreifen auf dem Trockenmittelbeutel blau bleibt.
	Konjugat – NICHT EINFRIEREN.
	Ungeöffnetes Testsystem, Kalibrierer, Positiv-Kontrollflüssigkeit und Negativ-Kontrollflüssigkeit, TMB, Probenverdünner
	Stopplösung: 2 - 25°C
	Waschpuffer (1X) : 20 - 25°C bis zu 7 Tage, 30 Tage zwischen 2 - 8°C.
	Waschpuffer (10X) : 2 - 25°C

PROBENAHME

1. Es wird von ZEUS Scientific empfohlen, dass die Probenahme durch den Benutzer in Übereinstimmung mit dem aktuellen NCCLS-Dokument M29: Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease erfolgt.
2. Keine Testmethode kann eine komplette Gewähr dafür liefern, dass humane Blutproben keine Infektionen übertragen. Deshalb müssen alle Blutderivate als potenziell infektiös behandelt werden.
3. Für diesen Test nur frisch entnommene und richtig gekühlte Sera verwenden, die mit zugelassenen aseptischen Venenpunkturnverfahren gewonnen wurden.^{20,21} Nicht verwenden, wenn Antikoagulantien oder Konservierungsmittel zugefügt sind. Hämolytierte, lipemische oder bakteriell kontaminierte Sera vermeiden.
4. Proben nicht länger als 8 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahren. Erfolgt der Test nicht innerhalb von 8 Stunden, können Sera zwischen 2 °C und 8°C bis zu 48 Stunden aufbewahrt werden. Wird eine noch längere Testverzögerung vorausgesehen, Testsera bei -20 °C oder darunter aufbewahren. Nicht mehrmals einfrieren/auftauen, weil dies zu einem Verlust der Antikörperaktivität und damit fehlerhaften Resultaten führen könnte. Es ist die Verantwortung der einzelnen Labors, alle verfügbare Literatur und/oder eigenen Studien zu Bestimmung der Stabilitätskriterien für das eigene Labor zu verwenden (24).

ASSAY-VERFAHREN

1. Die verschiedenen Komponenten aus der Aufbewahrung holen und auf Zimmertemperatur (20–25 °C) erwärmen lassen.
2. Die benötigte Anzahl Probenfelder feststellen. Sechs Kontrollflüssigkeit/Kalibrierer-Festlegungen pro Test (eine Leerwertprobe, eine Negativ-Kontrollflüssigkeit, drei Kalibrierer und eine Positiv-Kontrollflüssigkeit) einplanen. Bei jedem Test eine Leerwertprobe testen. Software- und Leseranforderungen für die korrekte Kontrollflüssigkeit/Kalibrierer-Konfiguration prüfen. Nicht verwendete Streifen in den wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel legen, versiegeln und zur Aufbewahrung zwischen 2 °C und 8 °C zurückbringen.

BEISPIEL PLATTENEINSTELLUNG		
	1	2
A	Leerwertprobe	Patient 3
B	Negativ-Kontrollflüssigkeit	Patient 4
C	Kalibrierer	usw.
D	Kalibrierer	
E	Kalibrierer	
F	Positiv-Kontrollflüssigkeit	
G	Patient 1	
H	Patient 2	

3. Eine 1:21 Verdünnung (z.B. 10 µl Serum + 200 µl Probenverdünner) von Negativ-Kontrollflüssigkeit, Kalibrierer, Positiv-Kontrollflüssigkeit und jedem Patientenserum herstellen.
4. Je 100 µL der verdünnten Kontrollflüssigkeiten, Kalibrierer und Patientenproben in Felder geben. Proben gut durchmischen. Für jede Probe einen neue Pipettenspitze verwenden.
5. 100 µl Probenverdünner als Leerwertprobe in Feld A1 geben. Software- und Leseranforderungen für die korrekte Felderkonfiguration für die Leerwertprobe prüfen.
6. Platte bei Zimmertemperatur (20-25°C) 25 ± 5 Minuten lang inkubieren.
7. Die Probenfelderstreifen 5 Mal waschen.
 - a. **Waschen von Hand:**
 1. Die Flüssigkeit kräftig aus den Feldern herausschütteln.
 2. Jedes Probenfeld mit Waschpuffer füllen. Sicherstellen, dass die Felder keine Luftbläschen enthalten.
 3. Schritte 1. und 2. für insgesamt 5 Wäschen wiederholen.
 4. Die Waschlösung aus den Feldern herausschütteln. Die Platte auf ein Papierhandtuch legen und kräftig klopfen, um alle Waschlösungsreste aus den Feldern zu entfernen. Die Platte visuell auf evtl. verbleibende Waschlösung inspizieren. Waschlösung in einem Einweg-Bassin sammeln und am Ende der täglichen Tests mit Desinfizierer behandeln.
 - b. **Automatisches Waschen:**
Bei Verwendung einer automatischen Probenfeld-Waschvorrichtung das Abgabevolumen auf 300–350 µl/Feld einstellen. Den Waschzyklus auf 5 Wäschen ohne Pause zwischen den Wäschen stellen. Falls nötig, die Probenfelderplatte aus dem Wäscher entnehmen, auf ein Papierhandtuch legen und kräftig klopfen, um alle Waschlösungsreste aus den Feldern zu entfernen.
8. 100 µl Konjugat mit derselben Rate und Reihenfolge wie bei den Proben in jedes Feld geben, einschließlich in das Feld mit Leerwertprobe.
9. Platte bei Zimmertemperatur (20-25°C) 25 ± 5 Minuten lang inkubieren.
10. Probenfelder wie in Schritt 7 beschrieben waschen.
11. 100 µl TM-Lösung mit derselben Rate und Reihenfolge wie bei den Proben in jedes Feld geben, einschließlich in das Feld mit Leerwertprobe.
12. Platte bei Zimmertemperatur (20-25°C) 10 ± 15 Minuten lang inkubieren.
13. Reaktion durch Zufügen von 50 µl Stopplösung mit derselben Rate und Reihenfolge wie bei TMB in jedes Feld stoppen, einschließlich in dem Feld mit Leerwertprobe. Positive Proben ändern ihre Farbe von blau zu gelb. Nach Zufügen der Stopplösung mehrmals an die Platte klopfen, um sicherzustellen, dass sich die Proben gut durchmischen.
14. Den Probenfeldleser auf eine Wellenlänge von 450 nm stellen und die optische Dichte (OD) jedes Feldes gegen die Leerwertprobe messen. Die Platte innerhalb von 30 Minuten nach Zufügen der Stopplösung lesen.

TESTVERFAHREN IN KURZFORM

1. Serum 1:21 verdünnen..
2. Verdünntes Serum in Probenfelder geben - 100µL/Feld.
3. \longrightarrow 25 bis 5 Minuten inkubieren.
4. Waschen.
5. Konjugat zufügen - 100µL/Feld.
6. \longrightarrow 25 bis 5 Minuten inkubieren..

7. Waschen.
8. TMB zufügen - 100µL/Feld.
9. $\xrightarrow{\text{5 bis 10 Minuten inkubieren}}$
10. Stopplösung zufügen - 50µL/Feld.
11. Innerhalb von 30 Minuten ABLESEN.

QUALITÄTSSICHERUNG

1. Bei jeder Prozedur muss der Kalibrierer dreifach angewendet werden. Eine Leerwertprobe, eine Negativ-Kontrollflüssigkeit und eine Positiv-Kontrollflüssigkeit sind ebenfalls einzubeziehen.
2. Den Mittelwert der drei Kalibriererfelder berechnen. Weicht einer dieser drei Werte um mehr als 15 % vom Mittelwert ab, diesen Wert verwerfen und den Mittelwert der anderen beiden Felder berechnen.
3. Der OD-Mittelwert für den Kalibrierer, für die Positiv- und Negativ-Kontrollflüssigkeiten sollten in die folgenden Bereiche fallen:

	<u>OD-Bereiche</u>
Negativ-Kontrollflüssigkeit	≤0,250
Kalibrierer	≥0,300
Positiv-Kontrollflüssigkeit	≥0,500

- a. Die OD der Negativ-Kontrollflüssigkeit dividiert durch die mittlere OD des Kalibrierers sollte $\leq 0,9$ ergeben.
- b. Die OD der Positiv-Kontrollflüssigkeit dividiert durch die mittlere OD des Kalibrierers sollte $\geq 1,25$ ergeben.
- c. Werden diese Bedingungen nicht eingehalten, muss der Test als ungültig gelten und wiederholt werden.
4. Die Positiv-Kontrollflüssigkeit und Negativ-Kontrollflüssigkeit dienen nur zur Überwachung eines erheblichen Reagenzversagens und garantieren keine Präzision am Test-Grenzwert.
5. Zusätzliche Kontrollflüssigkeiten können in Übereinstimmung mit Richtlinien oder Vorschriften von örtlichen oder staatlichen Stellen oder anerkannten Organisationen verwendet werden.
6. Siehe NCCLS Dokument C24: Statistical Quality Control for Quantitative Measurements Procedures für Hinweise zu sachgemäßen Maßnahmen zur Qualitätssicherung.

INTERPRETATION DER RESULTATE

1. Berechnungen:

- a. **Korrekturfaktor:** Ein Grenzwert für den OD-Wert von positiven Proben wurde vom Hersteller festgelegt und mit dem Kalibrierer korreliert. Der Korrekturfaktor (CF) ermöglicht die Festlegung des Grenzwerts für positive Proben unter Berücksichtigung von leichten Abweichungen der Testresultate von Tag zu Tag. Der Korrekturfaktor wird für jede Charge von Komponenten festgelegt und ist auf das Datenetikett in der Testsystem-Box aufgedruckt.
- b. **OD-Grenzwert:** Um den OD-Grenzwert zu erhalten, den CF mit dem oben berechneten mittleren OD-Wert des Kalibrierers multiplizieren.
($CF \times OD\text{-Mittel Kalibrierer} = OD\text{-Grenzwert}$)
- c. **Indexwerte oder OD-Raten:** Den Indexwert bzw. die OD-Rate für jede Probe durch Teilung ihres OD-Werts durch den OD-Grenzwert aus Schritt b berechnen.

Beispiel:	OD-Mittel Kalibrierer	=	0,793
	Korrekturfaktor (CF)	=	0,25
	OD-Grenzwert	=	$0,793 \times 0,25 = 0,198$
	Unbekannte Proben-OD	=	0,432
	Indexwert oder OD-Rate	=	$0,432/0,198 = 2,18$

2. Interpretations: Index Values/OD Ratios are interpreted as follows.

	<u>Indexwerte oder OD-Raten</u>
Negative Proben	≤0,90
Unbestimmte Proben	0,91 bis 1,09
Positive Proben	≥1,10

- a. Eine OD-Ratio von $\leq 0,90$ bedeutet, dass keine nachweisbaren IgM-Antikörper gegen HSV-1 oder HSV-2 vorhanden sind. Ein negatives Ergebnis bedeutet, dass keine frische oder reaktivierte HSV-1- oder HSV-2-Infektion vorliegt.
- b. Eine OD-Ratio von $\geq 1,10$ gilt als positiv für IgM-Antikörper gegen HSV-1 oder HSV-2. Dieses Testsystem ist nicht zur Differenzierung zwischen HSV-1 und HSV-2 geeignet. Ein positives Ergebnis deutet auf eine primäre oder reaktivierte HSV-1- oder HSV-2-Infektion hin.
- c. Proben mit Ratio-Werten im fragwürdigen Bereich (0,91–1,09) sollten erneut in doppelter Ausführung getestet werden. Das am häufigsten auftretende Ergebnis (zwei von drei) sollte ausgegeben werden. Proben, die wiederholt grenzwertig sind, sollten anhand einer alternativen Methode wie einem IFA getestet werden oder anhand einer weiteren Probennahme 2-3 Wochen später erneut evaluiert werden.
- d. Proben, die zu früh im Verlauf einer Primärinfektion entnommen wurden, enthalten u.U. keine nachweisbaren Konzentrationen von IgM-Antikörpern. Bei Verdacht auf eine Primärinfektion sollte nach 7–14 Tagen eine weitere Probe entnommen und zusammen mit der Originalprobe getestet werden, um eine Serokonversion festzustellen.

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Ein negatives Ergebnis schließt eine primäre oder reaktivierte HSV-1- oder HSV-2-Infektion nicht aus, da die Probe möglicherweise zu frühzeitig im Infektionsverlauf entnommen wurde oder der IgM-Titer auf eine nicht mehr nachweisbare Höhe gesunken ist.
2. HSV-spezifische IgG-Antikörper können mit IgM um Bindungsstellen konkurrieren und falsch-negative Ergebnisse verursachen. Falls zusammen mit spezifischen IgG in der Probe vorhanden, verursacht Rheumafaktor falsch-positive Ergebnisse. Das Probenverdünnungsmittel enthält ein Absorbens, das IgG aus der Testprobe entfernt und die Inzidenz von falschen Ergebnissen erheblich reduziert.
3. Bei Patienten, die mit dem Epstein-Barr-Virus infiziert sind, können heterotypische IgM-Antikörperantworten auftreten und im HSV-1 und -2 IgM-ZEUS ELISA falsch-positive Ergebnisse verursachen.
4. HSV-spezifische IgM-Antikörper können bei der Reaktivierung einer HSV-Infektion auftreten.^{1,2,3}
5. Die Ergebnisse des Herpes-1 und/oder -2 ZEUS-ELISA-Testsystems alleine sind nicht diagnostisch und sollten in Verbindung mit dem klinischen Bild des Patienten und den Ergebnissen anderer diagnostischer Verfahren interpretiert werden.
6. Bei immungeschwächten Patienten kann die Fähigkeit zur Bildung von IgM-Antikörpern beeinträchtigt sein und HSV-spezifische IgM können bei einer aktiven Infektion falsch-negativ sein.
7. Das anhaltende Vorliegen oder die Konzentration von Antikörpern kann nicht zum Nachweis eines Therapieerfolgs oder -versagens herangezogen werden.
8. Die Leistungsmerkmale des Tests bei Neugeborenen, Säuglingen oder bei Verwendung von Nabelschnurblut wurden noch nicht ermittelt.
9. Die Leistungscharakteristika bei visuellen Ergebnisbestimmungen wurden bisher nicht beurteilt.
10. Das Herpes-1 und/oder -2 ZEUS-ELISA-Testsystem ist nicht als Ersatz für eine Virusisolierung und/oder Identifizierung vorgesehen.
11. Aufgrund der Antigengemeinschaft können Infektionen mit einem HSV-Typ beim Vorliegen von Antikörpern gegen den heterologen Typ eine anamnestiche Antwort hervorrufen, wobei die Konzentration der präexistierenden Antikörper höher ansteigt als der Antikörpertiter gegen den Erreger der gegenwärtigen Infektion. Eine definitive HSV-Typisierung sollte daher anhand einer Virusisolierung erfolgen.
12. Die Leistungscharakteristika des Tests wurden bisher nur für Serumproben beurteilt.
13. Die Prävalenz des Analyten beeinflusst den Vorhersagewert des Tests.

REFERENZWERTE

Zur Bestimmung oder Schätzung der Referenz-Positivitätsrate wurden 219 Proben analysiert, die an zwei klinischen Labors getestet wurden. Diese Proben bestanden aus zwei Gruppen: 114 klinische Proben, die zur routinemäßigen HSV-Serologie an das Labor gesendet wurden und 105 randomisierte Proben gesunder Spender. Von den klinischen Proben waren 48/114 (42,1 %) positiv, 56/114 (49,1 %) negativ und 10/114 (8,8 %) fragwürdig. Von den Proben gesunder Spender waren 22/105 (21,0 %) positiv, 70/104 (66,7 %) negativ und 13/105 (12,4 %) fragwürdig.

LEISTUNGSSCHARAKTERISTIKA

1. Vergleichsstudie

Zum Nachweis der Gleichwertigkeit des HSV-1 und/oder HSV-2 IgM ZEUS-ELISA-Testsystems mit den Gesamtergebnissen zweier anderer ELISA-Testsysteme (HSV-1 und HSV-2), die gegenwärtig auf dem Markt erhältlich sind, wurden Vergleichsstudien durchgeführt. Die Leistung des HSV-1 und/oder HSV-2 IgM Zeus ELISA Testsystems wurde an zwei klinischen Prüfbüros beurteilt. Insgesamt wurden 219 Proben getestet; 100 Proben am ersten und 119 Proben am zweiten Prüfbüro. Die an Prüfbüro 1 getesteten Proben bestanden aus 50 Proben Gesunder und 50 klinischen Proben. Die an Prüfbüro 2 getesteten Proben bestanden aus 55 Proben Gesunder und 64 klinischen Proben. Von den klinischen Proben stammten 20 von Frauen im Alter von 17 bis 38 Jahren. Die Ergebnisse der Vergleichsstudie sind nachstehend in den Tabellen 1 bis 3 zusammengefasst:

Tabelle 1: Prüfbüro 1

		HSV-1 & 2 IgM-ZEUS-ELISA-Testsystem			
		Negativ	Fragwürdig*	Positiv	Gesamt
Kommerzielle ELISA-Testsysteme (zusammen)	Negativ	68	1	13	82
	Fragwürdig	0	0	0	0
	Positiv	4	0	14	18
	Gesamt	72	1	27	100

Relative Sensitivität = $14/18 = 77,8\%$, 95% Vertrauensintervall = 58,6% to 97,0%

Relative Spezifität = $68/81 = 84,0\%$, 95% Vertrauensintervall = 76,0% to 91,9%

Relative Übereinstimmung = $82/99 = 82,8\%$, 95% Vertrauensintervall = 75,4% to 90,3%

Tabelle 2: Prüfbüro 2

		HSV-1 & 2 IgM-ZEUS-ELISA-Testsystem			
		Negativ	Fragwürdig*	Positiv	Gesamt
Kommerzielle ELISA-Testsysteme (zusammen))	Negativ	66	1	2	69
	Fragwürdig	0	0	0	0
	Positiv	13	2	35	50
	Gesamt	79	3	37	119

Relative Sensitivität = $35/48 = 72,9\%$, 95% Vertrauensintervall = 60,3% to 85,5%

Relative Spezifität = $66/88 = 97,1\%$, 95% Vertrauensintervall = 93,0% to 100%

Relative Übereinstimmung = $101/116 = 87,1\%$, 95% Vertrauensintervall = 81,0% to 93,2%

Tabelle 3: Prüfbüro 1 und 2 zusammen

		HSV-1 & 2 IgM-ZEUS-ELISA-Testsystem			
		Negativ	Fragwürdig*	Positiv	Gesamt
Kommerzielle ELISA-Testsysteme (zusammen)	Negativ	134	2	15	151
	Fragwürdig	0	0	0	0
	Positiv	17	2	49	68
	Gesamt	151	4	64	219

Relative Sensitivität = $49/66 = 74,2\%$, 95% Vertrauensintervall = 63,7% to 84,8%

Relative Spezifität = $134/149 = 89,9\%$, 95% Vertrauensintervall = 85,1% to 94,8%

Relative Übereinstimmung = $183/215 = 85,1\%$, 95% Vertrauensintervall = 80,4% to 89,9%

* Daten von den Berechnungen ausgeschlossen

HINWEIS: Die Bezeichnung „relativ“ bezieht sich auf den Vergleich der Ergebnisse dieses Tests mit den Ergebnissen ähnlicher Tests. Es wurde kein Versuch unternommen, die Testergebnisse mit dem Vorliegen oder Fehlen einer Erkrankung zu korrelieren. Die Präzision des Vergleichstests zur Vorhersage einer Erkrankung kann nicht beurteilt werden.

2. Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit wurde intern bestimmt. Insgesamt wurden sechs stark positive bis negative Proben getestet. Zusätzlich zu diesen sechs Proben wurden die stark positive Kontrolle und die negative Kontrolle des Testsystems als zwei weitere Präzisionsproben getestet. Jede Probe wurde an drei Tagen einmal täglich in dreifacher Ausführung getestet. Die Ergebnisse wurden zur Berechnung der Intra- und Inter-Assay-Präzision herangezogen.

Ch.A	Intra-Assay (3)						Inter-Assay (n=24)	
	Tag 1		Tag 2		Tag 3			
Proben-Nr.	Mittlere Ratio	VK %	Mittlere Ratio	VK %	Mittlere Ratio	VK %	Mittlere Ratio	VK %
Probe 1	3,36	2,7	3,13	11,3	3,18	3,7	3,22	6,8
Probe 2	2,52	3,0	1,99	9,3	2,09	7,3	2,20	12,5
Probe 3	1,97	1,8	1,88	7,4	2,00	1,9	1,95	4,7
Probe 4	1,05	2,5	0,98	9,3	1,00	9,4	1,01	7,4
Probe 5	0,18	11,5	0,38	6,5	0,25	13,4	0,27	33,8
Probe 6	0,28	2,4	0,22	17,8	0,22	1,9	0,24	14,6
NC	0,08	21,2	0,13	11,2	0,00	0,0	0,07	84,0
PC	2,19	1,9	2,09	0,8	2,12	2,6	2,13	2,5

Ch. B	Intra-Assay (3)						Inter-Assay (n=24)	
	Tag 1		Tag 2		Tag 3			
Proben-Nr.	Mittlere Ratio	VK %	Mittlere Ratio	VK %	Mittlere Ratio	VK %	Mittlere Ratio	VK %
Probe 1	3,72	2,0	3,20	4,6	3,08	5,5	3,33	9,6
Probe 2	2,29	3,8	1,89	4,6	1,64	13,7	1,94	16,2
Probe 3	1,58	10,9	1,48	7,8	1,29	5,6	1,45	11,6
Probe 4	0,88	10,6	0,87	3,5	0,81	5,5	0,85	7,2
Probe 5	0,40	16,0	0,27	21,0	0,18	39,2	0,28	39,2
Probe 6	0,17	3,6	0,12	39,2	0,07	68,0	0,12	44,1
NC	0,04	63,0	0,20	33,1	0,16	29,3	0,13	63,9
PC	2,46	2,7	2,09	6,0	2,16	4,0	2,24	8,5

Ch. C	Intra-Assay (3)						Inter-Assay (n=24)	
	Tag 1		Tag 2		Tag 3			
Proben-Nr.	Mittlere Ratio	VK %	Mittlere Ratio	VK %	Mittlere Ratio	VK %	Mittlere Ratio	VK %
Probe 1	3,18	2,9	3,69	5,2	3,02	2,4	3,30	9,8
Probe 2	1,31	1,7	2,32	3,0	2,07	1,0	1,90	24,0
Probe 3	2,21	3,2	2,34	6,2	1,98	3,6	2,17	8,3
Probe 4	1,14	6,6	1,19	8,5	0,99	6,0	1,11	10,5
Probe 5	0,27	3,0	0,36	28,3	0,29	22,3	0,30	23,6
Probe 6	0,28	0,6	0,28	5,4	0,22	9,3	0,26	12,7
NC	0,13	11,8	0,15	15,7	0,30	7,3	0,19	43,0
PC	2,15	0,9	2,51	3,7	2,11	2,7	2,26	8,9

3. Kreuzreaktivität

Zur Untersuchung auf potenzielle positive Reaktionen aufgrund von kreuzreagierenden Antikörpern wurden 24 Proben, die positiv für IgM-Antikörper gegen verschiedene Viren (EBV-EA, EBV-VCA, CMV und Rubella) waren, mit dem HSV-1 und/oder 2 IgM-ZEUS-ELISA-Testsystem getestet. Achtzehn der vierundzwanzig (18/24) Proben waren negativ für IgM gegen HSV-1 und/oder HSV-2 und sechs der vierundzwanzig Proben (6/24) waren positiv. Von den positiven Proben stammten vier aus der EBV-VCA-Gruppe und zwei aus der CMV-Gruppe. Zur Bestätigung der positiven HSV-1- und HSV2-Reaktionen wurde ein IFA durchgeführt. Nur eine Probe (aus der EBV-VCA-Gruppe) war im IFA positiv.

LITERATUR

- 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.
- Nahmias AJ, Dannenberg J, Wickliffe C, and Muther J: Clinical aspects of infection with Herpes Simplex viruses I and II. In: AJ Nahmias, WR Dowdle and RF Schinazi, eds., *The Human Viruses, and Interdisciplinary Perspective*, Elsevier/North - Holland Publishing Co., New York, pp 2, 1980.
- 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.
- Whitley RJ and Hutto C: Neonatal Herpes Simplex virus infections. *Ped. Rev.* 7:119, 1985.
- Denoyel Ga, Gaspar A, and Novyrgat C: Enzyme immunoassay for measurement of antibodies to Herpes Simplex virus infection: Comparison of complement fixation, immunofluorescent-antibody, and neutralization techniques. *J. Clin. Micro.* 11:114-119, 1980.
- 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.
- 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.
- 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.
- Engvall E, and Perlman P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.* 8:874, 1971.
- 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.
- Voller A, Bartlett A, and Bidwell DE: Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J. Clin. Path.* 31:507, 1978.
- 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.
- 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.
- Fraser KB, Shirodaria PV, and Stanford CF: Fluorescent staining and human IgM. Salonen E-M, Vaheri A, Suni J, and Wager O: Rheumatoid factor in acute viral infections: Interference with determination of IgM, IgG and IgA antibodies in an enzyme immunoassay. *J. Infect. Dis.* 142:250-255, 1980.
- Pyndiah N, Krech U, Price P, and Wilhelm J: Simplified chromatography separation of immunoglobulin M from G and its application to Toxoplasma indirect immunofluorescence. *J. Clin. Micro.* 9:170-174, 1979.
- Sumaya CV, Ench Y, and Pope RM: Improved test for IgM antibody to Epstein-Barr virus using an absorption step with Staphylococcus aureus. *J. Infect. Dis.* 146, 518-523, 1982.
- Johnson RB, and Libby R: Separation of immunoglobulin M (IgM) essentially free of IgG from serum for use in systems requiring assay of IgM-type antibodies without interference from rheumatoid factor. *J. Clin. Micro.* 12:451-454, 1980.
- Joassin L, and Reginster M: Elimination of nonspecific cytomegalovirus immunoglobulin M activities in enzyme-linked immunosorbent assay by using antihuman immunoglobulin G. *J. Clin. Micro.* 23:576-581, 1984.
- Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Third Edition: Approved Standard (1991). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens: NCCLS H18-A, 1999.
- Charnesky MA, Ray CG and Smith TF: *Laboratory diagnosis of viral infections*. Cumitech 15, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1982.
- U.S. Department of Labor (OSHA): Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens. Final Rule. 21CFR 1910.1030.
- 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, Option 2
 International: +1 908-526-3744
 Fax: +1 908-526-2058
 Website: www.zeusscientific.com
 ZEUS ELISA und SaVe Diluent® sind Markenzeichen von ZEUS Scientific, Inc

Für Kundenservice in den USA kontaktieren Sie bitte Ihren Händler vor Ort.
 Für Technischen Support in den USA kontaktieren Sie ZEUS Scientific durch einen gebührenfreien Anruf oder einer E-Mail an support@zeusscientific.com.
 Für Kundenservice und Technischen Support außerhalb der USA kontaktieren Sie bitte Ihren Händler vor Ort.
 © 2017 ZEUS Scientific, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

