

## INSTRUÇÕES DE USO – HSV IgM

### Teste de ELISA para detecção do HSV IgM – SV09

Teste de ELISA para determinação qualitativa de anticorpos IgM contra o vírus do *Herpes simplex* 1&2 em soro ou plasma humano.

Kit suficiente para 96 determinações.

#### SUMÁRIO

Os vírus do Herpes simplex tipos 1 e 2 (HSV 1&2) possuem uma extensa cadeia de DNA, que durante a infecção é capaz de induzir a síntese de uma variedade de proteínas cujos determinantes antigênicos têm alto nível de reatividade cruzada e poucos são tipo-específicos.

A maioria das infecções primárias e genitais recorrentes é causada pelo HSV 2, enquanto as infecções não-genitais pelo HSV 1.

A detecção de anticorpos IgG e IgM específicos para os vírus é importante no diagnóstico de infecções primárias agudas ou da reativação de infecções latentes, na ausência de sintomas clínicos evidentes. Infecções assintomáticas podem ocorrer em indivíduos aparentemente saudáveis e durante a gravidez, e infecções severas, em pacientes imunocomprometidos ou suprimidos, nos quais a doença pode evoluir para patologias graves.

A determinação dos anticorpos específicos para HSV é importante no monitoramento de pacientes de risco e no acompanhamento de infecções agudas e severas.

#### PRINCÍPIO

As amostras de soro ou plasma diluídas e os controles, são adicionados, aos pocinhos da microplaca, recobertos com antígenos do vírus HSV 1&2. Durante a incubação, os anticorpos específicos do tipo IgM, presentes nas amostras e controle positivos, se ligam aos antígenos imobilizados.

Após lavar todos os outros componentes da amostra, na 2ª incubação as IgM anti-HSV 1&2 ligadas são detectadas pela adição de anticorpos anti-IgM humanas, marcados com peroxidase.

A enzima capturada na fase sólida, agindo com cromógeno/ substrato, gerando um sinal óptico proporcional à quantidade de anticorpos IgM anti-HSV 1&2, presentes na amostra.

O tratamento da amostra com um reagente capaz de bloquear as IgG reduz as reações falso-positivas atribuídas à presença destas imunoglobulinas e do fator reumatóide.

**Tempo de Incubação:** 2 horas e 20 minutos

## COMPONENTES DO KIT

- Reagentes suficientes para 96 determinações.
  - Conservar entre 2 a 8°C.
1. **MICROPLACA:** 1 placa, com 12 tiras com 8 pocinhos recobertos com antígenos inativados do HSV 1&2. Embalagem selada com dessecante.  
**Pronta para uso.**
  2. **DILUENTE DA AMOSTRA\*:** 100 mL, solução protéica tamponada com conservantes.  
**Pronta para uso.**
  3. **REAGENTE NEUTRALIZANTE\*:** 8 mL, solução protéica tamponada com conservantes.  
**Pronto para uso.**
  4. **CONTROLE POSITIVO\*:** 2 mL, soro humano contendo anticorpos IgM específicos para HSV 1&2, diluído em solução tampão com conservantes.  
**Pronto para uso.**
  5. **CONTROLE NEGATIVO\*:** 2 mL, soro humano isento de anticorpos IgM específicos para HSV 1&2, diluído em solução tampão com conservantes.  
**Pronto para uso.**
  6. **SOLUÇÃO DE LAVAGEM\*\*:** 60 mL, solução tampão com conservantes.  
**Preparo:** Diluir 1 parte da solução concentrada para 19 partes (1+19) de água deionizada (exemplo: 10 mL+190 mL); volume total de 1200 mL. Cristais na solução concentrada desaparecerão após aquecimento em banho-maria a 37° C.  
**Concentrada 20x**
  7. **CONJUGADO\*\*\*:** 0,750 mL, anticorpo anti-IgM humano marcado com peroxidase, em solução tampão com estabilizantes e conservantes.  
**Preparo:** Para obter o conjugado diluído, diluir 1 parte do mesmo para 19 partes (1+19) de diluente do conjugado (exemplo: 1 mL + 19 mL). Preparar somente a quantidade a ser utilizada. Agitar em vórtex antes do uso.  
**Concentrado 20x**
  8. **DILUENTE DO CONJUGADO\*\*\*:** 15 mL, solução protéica tamponada com conservantes.  
**Pronto para uso.**
  9. **SUBSTRATO:** 12 mL, solução tamponada de tetrametilbenzidina (TMB) estabilizada contendo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).  
**Pronto para uso**
  10. **SOLUÇÃO DE PARADA:** 15 mL, Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 M.  
**Pronta para uso**

11. **FOLHAS ADESIVAS:** 2 unidades

12. **MANUAL DE INSTRUÇÕES DE USO**

\* Contém 0,1% de azida sódica e 0,1% de Kathon GC

\*\* Contém 0,1% de timerosal

\*\*\* Contém 0,2% de gentamicina e 0,1% de Kathon GC

#### **ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO**

1. Os reagentes e a microplaca, na embalagem original inviolada, são estáveis até a data de validade, determinada na etiqueta, se conservados entre 2 a 8 °C.
2. Manter as tiras da microplaca não utilizadas na embalagem original fechada, protegidas da umidade e da luz (com o dessecante e lacrada). Depois de aberta estável por 4 semanas respeitadas as condições recomendadas de armazenamento.
3. A solução de lavagem diluída é estável por uma semana entre 2 a 8 °C.
4. O Imunocomplexo não é estável. Preparar somente a quantidade a ser utilizada. O volume excedente deve ser armazenado a – 20 °C.

#### **IMPORTANTE**

1. Não usar reagentes após o vencimento.
2. No procedimento de lavagem usar somente a SOLUÇÃO DE LAVAGEM 20X fornecida no kit e seguir cuidadosamente as recomendações da seção INSTRUÇÕES DE LAVAGEM.

#### **MATERIAL NÃO INCLUSO NO KIT**

- Micropipetas calibradas para 10, 100 e 1000 uL. Respectivas ponteiros descartáveis.
- Misturador tipo vórtex e papel absorvente.
- Água Tipo I (deionizada)
- Cronômetro
- Sistema de lavagem de placas manual ou automático com capacidade para 300uL.
- Leitor de ELISA fotométrico com filtros a 450 nm e 620-630 nm

#### **PRECAUÇÕES DE USO**

**Somente para o uso em diagnóstico *in vitro*.**

#### **“MATERIAIS POTENCIALMENTE INFECCIOSOS”**

- Os controles, contendo componentes de natureza humana, foram testados e determinados como não-reativos para os anticorpos contra HCV e HIV. Apesar disto, não há nenhum método de teste que possa oferecer completa confiabilidade para ausência do vírus do HIV e da Hepatite B ou de outros agentes infecciosos. Portanto, estes reagentes devem ser manipulados como materiais potencialmente infecciosos,

conforme Procedimentos de manipulação de Amostras Biológicas do Laboratório de Análises.

- Não devem ser utilizados componentes de diferentes lotes ou reagentes de outros fabricantes. Evitar contaminação cruzada de reagentes e amostras.
- Os restos de amostras, reagentes e líquido de descarte devem ser descontaminados com solução desinfetante, tal como hipoclorito de sódio 5%, antes de serem desprezados. Após procedimento de desinfecção, desprezar em pia com água em abundância.
- Resultados ótimos são obtidos através de rigorosa realização do teste conforme instruções dadas. Pipetagem precisa, incubação respeitando os limites de tempo e temperatura requerida é fundamental para o sucesso do teste.
- Para descartar os reagentes e o material biológico sugerimos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental. Maiores informações, consultar as FISPQ's dos produtos obtidas pelo e-mail [btibiotec@biotec.com.br](mailto:btibiotec@biotec.com.br) ou pelo telefone (11) 5093.2288.

#### COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

- Coletar as amostras de sangue e processá-las imediatamente para obtenção de soros ou plasmas sem hemólise.
- Evitar o uso de soros ou plasmas hemolisados, ictericos ou lipêmicos.
- As amostras devem ser refrigeradas de +2 a +8°C por até 7 dias, ou congeladas a -20°C por até 6 meses. Evitar congelar e descongelar mais de uma vez, pois as IgM podem ser danificadas.

#### PREPARAÇÃO DO TESTE

1. **Antes da realização do teste, estabilizar todos os reagentes e amostras à temperatura ambiente (+20 a +25°C), e homogeneizar suavemente.**
2. Diluir cada amostra de soro/plasma a ser testado com diluente da amostra, na proporção de 1+101 (exemplo: 10 µL de amostra + 1 mL de diluente), homogeneizando bem, sem provocar a formação de espuma. **Os padrões da curva são prontos para uso.**
3. Montar protocolo de identificação e orientação de aplicação das amostras e controles na placa onde será realizada a análise
4. Deixar que a placa atinja a temperatura ambiente antes de abrir a embalagem. Separar somente as tiras necessárias à realização do teste, mantendo as restantes na embalagem plástica com dessecante, retirando o ar e fechando a embalagem hermeticamente.
5. Seguir a orientação abaixo para dispensar o controle positivo (CP) e negativo (CN) **SEMPRE EM DUPLICATA**, reservar um poço para o branco:

Reagente	Posição
Branco	A1
CP	B1, C1
CN	D1, E1
Amostras	a partir de F1

6. Preparar a solução de lavagem diluída adicionando 60 mL da solução 20x concentrada a 1140 mL de água destilada ou deionizada, para um volume total de 1200 mL (ou volume menor, sempre na proporção de 1+19). Armazenar a temperatura ambiente.

7. Diluir o CONJUGADO 20X na proporção de 1+19 usando o diluente do conjugado(exemplo: para um volume final de 1 mL misturar 50µL de conjugado 20X em 950µL de diluente de conjugado) . Preparar somente a quantidade a ser utilizada, pois a solução não é estável por longo período. Agitar em vórtex antes do uso.

### **INSTRUÇÕES DE LAVAGEM**

Um bom procedimento de lavagem é essencial para obter-se dado analítico correto e preciso.

Recomendamos a utilização de uma lavadora de microplacas de ELISA de boa qualidade, mantida no mais alto grau de performance de lavagem. Geralmente, 4-5 ciclos de lavagem são suficientes para evitar reações falso-positivos e coloração de fundo.

No caso de lavagem manual, sugerimos a realização de 5 ciclos, dispensando 300 µL/poço e aspirando o líquido 5 vezes.

Em qualquer um dos casos, o líquido aspirado tem que ser tratado com solução de hipoclorito de sódio a 5% por 24 horas anterior ao descarte.

### **REALIZAÇÃO DO TESTE**

1. Dispensar 50 µL de Reagente Neutralizante nos pocinhos correspondentes das amostras. Deixar vazio o pocinho A1 do branco e dos Controles positivo e negativo.

2. Dispensar nos pocinhos apropriados, conforme protocolo de aplicação das amostras, montado pelo manipulador da análise no Laboratório de Análises Clínicas, 100 µL de cada controle positivo e negativo e de cada amostra (sempre em duplicata), nos respectivos pocinhos das tiras. Deixar o pocinho A1 vazio para o branco. **Atenção: cobrir com folha adesiva e incubar por 1 hora a 37 °C.**

3. Aspirar o conteúdo de todos os pocinhos e lavar 4 a 5 vezes com **300 µL da solução de lavagem diluída**. Esta etapa deve ser realizada adequadamente, para garantir resultados confiáveis e precisos. Remover o fluido restante batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente.

4. Dispensar 100 µL da solução de conjugado diluída em cada pocinho, exceto no pocinho A1 do branco. **Atenção: Cobrir com a folha adesiva e incubar por 1 hora a 37°C.**

5. Aspirar o conteúdo de todos os pocinhos e lavar 4 a 5 vezes com **300 µL da solução de lavagem diluída**. Esta etapa deve ser realizada adequadamente, para garantir resultados confiáveis e precisos. Remover o fluido restante batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente.

6. Dispensar 100 µL do cromógeno/substrato em todos os pocinhos inclusive no branco. Cobrir novamente e incubar por exatamente **20 minutos à temperatura ambiente** (+20 a +25°C), ao abrigo da luz

7. Adicionar 100 µL da solução de parada a todos os pocinhos (inclusive no branco), para interromper a reação.

8. Ler a absorvância a 450 nm com o leitor de ELISA dentro de no máximo 30 minutos. Usar o pocinho A1 como "branco" para zerar o aparelho ou, quando isso não for possível, descontar o valor do "branco" de todos os valores medidos.

#### CONTROLE DE QUALIDADE

O teste executado é considerado **válido** desde que os seguintes critérios sejam observados:

DO450 nm do Branco do substrato (A1)	<b>&lt; 0,100</b>
Depois de descontado o branco (A1), o valor médio da DO450 nm do Controle Negativo (CN)	<b>&lt; 0,200</b>
Depois de descontado o branco (A1), o valor médio da DO450 nm do Controle Positivo (CP)	<b>&gt; 1,000</b>

#### CÁLCULO DOS RESULTADOS

Quando não for possível zerar o aparelho, descontar o valor da Absorvância do branco das demais Absorvâncias obtidas.

Calcular o **valor médio** dos controles negativos e positivos usando a fórmula a seguir:

$$VM = \frac{(Abs1 + Abs2)}{2}$$

Se o teste tornar-se válido, calcular o valor do **cutoff (CO)** pela fórmula:

$$CO = CN + 0,250$$

#### INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Valores (médios) de Absorvância dos soros <b>maiores que CO + 20%.</b>	<b>POSITIVO</b>
Valores (médios) de Absorvância dos soros <b>entre CO e CO + 20%.</b>	<b>INDETERMINADO</b>
Valores (médios) de Absorvância dos soros <b>menores que CO.</b>	<b>NEGATIVO</b>

**NOTA IMPORTANTE:** É reportado na literatura médica a ocorrência de reações falso-positivas em ensaios de ELISA "sandwich" para IgM na faixa de 2-5% devido a altos níveis de Fator Reumatóide.

## **LIMITAÇÕES DO TESTE**

O resultado do teste obtido utilizando este kit serve apenas como auxiliar ao diagnóstico clínico e deve ser interpretado associando-se às histórias clínicas dos pacientes, achados clínicos e outros procedimentos de diagnóstico.

Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios para interpretação dos testes, baseando-se na população em estudo.

Amostras lipêmicas, ictéricas e hemolizadas podem causar resultados errôneos, portanto, não devem ser utilizadas.

## **PERFORMANCES**

### **Sensibilidade**

A sensibilidade do ensaio foi calculada usando um painel de amostras positivas, testadas com um kit comercial de referência. O teste apresenta sensibilidade maior de 98%.

### **Especificidade**

A especificidade do ensaio foi calculada usando um painel de amostras negativas, testadas com um kit comercial de referência. O teste apresenta sensibilidade maior de 99%.

### **Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade do ensaio foi calculada usando os controles negativos e positivos testados em réplicas em diferentes dias. Um coeficiente de variação entre 4-12% foi obtido dependendo dos valores de OD 450nm.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Engvall E & Perlmann P. J Immunochem 8: 871, 1971.
- Engvall E & Perlmann P. J Immunol 109: 129, 1971.
- Remington JS & Klein JO. In: Infectious diseases of fetus and newborn infant. Sanders, Philadelphia, London, Toronto, 1996.
- Volk WA. In: Essential of Medical Microbiology, 2nd ed, pp 729, GB Lippincott Co, Philadelphia, New York, S Jose, Toronto, 1982.
- Leinikki PO et al. J Clin Microbiol 8: 418, 1978.
- Piroid E et al. Révue Méd Vet 131: 25, 1980.
- Vaheri A et al. J Med Virol 5: 171, 1980.
- Vejtorp M et al. Acta Path Microbiol Scand 88: 349, 1980.
- Voller A et al. Brit J Exp Pathol 56: 338, 1975.

FABRICADO POR: **BTI – Bio Tecnologia Industrial Ltda**  
CNPJ: 03.654.699/0001-00 SAC (11) 5093.2288 – sac@btibiotec.com.br  
Av. José Cândido da Silveira 2100 – sls 09, 10 e 18 - Horto  
Cep: 31.170-000 - Belo Horizonte – MG – Brasil  
**Resp. Técnico: Dr. Luiz Eduardo De Nicola - CRBM 1452**  
**MS: 8004957.0104**