

**VIROTECH HSV 1 (gG1) IgG/IgM ELISA
(HSV 1 (gG1) IgG/IgM ELISA)**

Bestell-Nr.: EC130.00 Farbcodierung: rot/schwarz

HSV 1 (gG1) IgG Liquor/CSF Standards

Bestell-Nr.: EC130L60

**VIROTECH HSV 2 (gG2) IgG/IgM ELISA
(HSV 2 (gG2) IgG/IgM ELISA)**

Bestell-Nr.: EC131.00 Farbcodierung: rot/dunkelblau

HSV 2 (gG2) IgG Liquor/CSF Standards

Bestell-Nr.: EC131L60

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Inhalt

1. Verwendungszweck	3
2. Diagnostische Bedeutung	3
3. Testprinzip	4
4. Packungsinhalt (IgG und IgM Testkit).....	4
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	5
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert).....	5
8. Testdurchführung	5
8.1 Untersuchungsmaterial	5
8.2 Vorbereitung der Reagenzien	6
8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung.....	6
8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren	6
9. Testauswertung.....	7
9.1 Testfunktionskontrolle	7
9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE).....	7
9.3 Auswertungsschema IgG und IgM	7
9.4 Grenzen des Tests.....	7
10. Leistungsdaten.....	8
10.1 Diagnostische Sensitivität (Positive Percent Agreement) und Spezifität (Negative Percent Agreement)	8
10.2 Durchseuchung (erwartete Werte)	9
10.3 Interferente Substanzen	10
10.4 Kreuzreaktivität	10
10.5 Messbereich	12
10.6 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)	12
10.7 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)	12
11. Literatur.....	12
12. Testablaufschem.....	14

1. Verwendungszweck

Der VIROTECH HSV 1 (gG1) IgG/IgM ELISA bzw. der VIROTECH HSV 2 (gG2) IgG/IgM ELISA dient dem semiquantitativen und qualitativen Nachweis spezifischer IgG/IgM- Antikörper gegen *Herpes simplex Virus* (HSV) im Humanserum.

Die Serologie ist nur zur Bestimmung des Immunstatus und des Herpes-Ausschlusses geeignet. Die Verwendung der typ-spezifischen Glycoproteine G, gG1 bzw. gG2 ermöglicht die Differenzierung zwischen HSV 1 und HSV 2 zur Bestimmung der Seroprävalenz, sowie zur Identifizierung von potentiellen Virus-Überträgern.

Das IgM-Ergebnis darf nicht isoliert vom IgG-Ergebnis betrachtet werden.

Die Diagnose des Genital-Herpes muss durch den Erregernachweis gesichert werden.

Da zum Zeitpunkt der Geburt das Immunsystem des Säuglings noch nicht vollständig ausgebildet ist, ist die Serologie zum Nachweis des Neugeborenen Herpes nicht geeignet, sie kann aber retrospektiv zur Messung der transplazentar übertragenen anti-HSV 2 IgG-Antikörper Anwendung finden.

2. Diagnostische Bedeutung

Herpes simplex Viren weisen eine hohe Durchseuchung in der Bevölkerung auf, da sie durch engen körperlichen Kontakt über die Schleimhäute übertragen werden. Die erste Infektion mit HSV-1 tritt am häufigsten während der Kindheit nach dem Verlust des mütterlichen Schutzes innerhalb des ersten Lebensjahres auf. HSV-2 wird hauptsächlich durch Geschlechtsverkehr übertragen, dementsprechend steigen die Infektionsraten erst mit der Pubertät an (16).

Obwohl die Primärinfektionen zu über 90% asymptomatisch bleiben, etabliert sich in der Regel eine latente Infektion in den regionalen Ganglien. Für das Verständnis der Pathogenese von HSV-Infektionen ist die Tatsache entscheidend, dass latent in Ganglienzellen persistierende Viren reaktiviert werden können. Durch die asymptomatische Virusausscheidung über Speichel und Genitalsekret wird die Weiterverbreitung des Virus begünstigt. Im orofazialen Bereich überwiegen die HSV 1-Infektionen während im Genitalbereich die Infektionen überwiegend durch HSV 2 hervorgerufen werden, nur ein geringer Teil (5-30%) wird durch HSV 1 verursacht (11, 14).

Eine der schwerwiegendsten Folgen eines genitalen Herpes ist eine Herpesinfektion des Neugeborenen (2). Erfolgt keine Behandlung, liegt die Sterblichkeitsrate bei Kleinkindern mit einer disseminierten Infektion über 70%, und nahezu die Hälfte der Überlebenden entwickelt neurologische Schäden (14). Fast alle HSV 2-Infektionen bei Neugeborenen werden bei der Passage durch den Geburtskanal erworben (7). Die meisten Mütter (60 bis 80%), die Herpes Viren auf ihre Kinder übertragen, sind zum Zeitpunkt der Geburt asymptomatisch (14). Die Übertragungsraten sind besonders hoch, wenn die Mutter zu diesem Zeitpunkt eine primäre oder eine erstmalige genitale Infektion aufweist (50%) (14). Liegt eine Wiederholungsinfektion vor, ist die Übertragungsrate geringer (< 5%) (4, 5, 9). Die Empfehlung der CDC lautet, „dass die Prävention einer Herpesinfektion von Neugeborenen die Notwendigkeit der Prävention des Erwerbs einer genitalen HSV-Infektion während der späten Schwangerschaftsphase hervorhebt. Frauen mit einem erhöhten Risiko, d.h. einem Partner mit einer oralen oder genitalen HSV-Infektion oder mit unbekanntem Infektionsstatus, sollten entsprechende Beratung erhalten, um ungeschützten oder oralen sexuellen Kontakt während der späten Schwangerschaftsphase zu vermeiden“ (7).

Zur Diagnose einer HSV-Infektion kann die Isolation des Virus, direkte Fluoreszenzantikörper Tests (DFA) und serologische Tests herangezogen werden. Nachteile der ersten beiden Methoden sind jedoch die Länge der Kultivationsdauer, Schwierigkeiten bei der Gewinnung der Proben und deren Transport, sowie die Komplexität des Verfahrens und andere Variablen in Verbindung mit DFA-Tests und Kultivierung (1, 7). Aufgrund der hohen Kreuzreaktivität zwischen HSV 1 und HSV 2 sind die serologischen Verfahren, die Viruslysate als Antigene benutzen, nicht ausreichend geeignet, HSV 1- von HSV 2-Infektionen zu unterscheiden. Aufgrund der hohen Durchseuchung mit HSV 1 kann der serologische Status für HSV 2 mit solchen Verfahren nur schwer zuverlässig bestimmt werden (14).

Bei der Herpesenzephalitis treten intrathekale IgG-Antikörper erst 8-10 Tage nach den klinischen Symptomen auf, IgM-Antikörper werden nicht regelmäßig und wenn nur kurzzeitig und in geringer Konzentration gebildet, d.h. die Serologie kann hier nachträglich zur Bestätigung der klinischen Diagnose genutzt werden.

Die genitalen HSV 1-Infektionen rezidivieren wesentlich seltener als HSV 2-Infektionen. Eine vorausgegangene genitale Infektion mit HSV 1 scheint einen gewissen Schutz vor einer Infektion mit HSV 2 zu bieten bzw. die Symptome zu mildern oder gänzlich zu verhindern (10). Eine vorausgegangene orale HSV 1-Infektion stellt keinen Schutz gegen eine genitale HSV 2-Infektion dar (14). Das klinische Erscheinungsbild des genitalen Herpes entspricht in etwa demjenigen anderer

Geschwürbildungen an den Geschlechtsorganen und ist demnach differentialdiagnostisch gegenüber *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum* und *Chlamydia trachomatis* zu unterscheiden (7).

Herpes-simplex Liquordiagnostik

In der Liquordiagnostik hat im Gegensatz zur serologischen HSV-Infektionsdiagnostik der sichere Nachweis einer ZNS-eigenen erregerspezifischen Antikörpersynthese immer Vorrang vor einer eventuellen Differenzierung zwischen den Erregerspezies HSV 1 und HSV 2. Durch die Kombination hochaufgeklärter HSV 1- und HSV 2-Lysatantigene im VT HSV-Screen-Test, steht mit diesem Testsystem ein für die Liquordiagnostik sehr gut geeigneter, weil hochsensitiver Screening-Test auf HSV-Infektionen des ZNS zur Verfügung. Die Verwendung eines breiten Spektrums hochaufgeklärter HSV-Antigene im VT-HSV-Screen bewirkt neben der erwünschten hohen Sensitivität auch eine ebenso wünschenswerte Spezifität bezüglich der Abgrenzung von ZNS-Infektionen durch andere neurotrope Erreger der Herpesvirus-Gruppe. Wir empfehlen daher, die Antikörper-Index-(AI)-Bestimmung in der Herpes simplex Diagnostik zunächst mit dem HSV Screen-ELISA durchzuführen.

Wird über den erfolgten Nachweis einer HSV-ZNS-Infektion hinaus eine Differenzierung zwischen HSV 1 und HSV 2 angestrebt, kann dies mit Hilfe der beiden speziesspezifischen gG1 und gG2 ELISA -Teste erfolgen.

Grenzen: Die zum Zeitpunkt der Liquorentnahme im ZNS synthetisierte erregerspezifische Antikörpermenge gegen die Epitope der gG1- oder gG2-Antigene kann jedoch (noch oder schon) zu gering sein, um eine AI-Erhöhung zu bewirken. Die alleinige Durchführung des gG1 oder gG2 Testes kann daher zur Folge haben, dass in einigen bzw. bestimmten Fällen ein falsch negatives Ergebnis im Sinne nicht berechenbarer oder normaler Antikörper-Indizes generiert wird.

3. Testprinzip

Der im Humanserum gesuchte Antikörper bildet mit dem auf der Mikrotiterplatte fixierten Antigen einen Immunkomplex. Nicht gebundene Immunglobuline werden durch Waschprozesse entfernt. Mit diesem Komplex verbindet sich das Enzym-Konjugat. Nicht gebundene Immunglobuline werden wiederum durch Waschprozesse entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung (TMB) entsteht durch Enzymaktivität (Peroxidase) ein blauer Farbstoff, der nach Zugabe der Stopplösung nach Gelb umschlägt.

4. Packungsinhalt (IgG und IgM Testkit)

1. **1 Mikrotiterplatte**, bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
2. **PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig), 2x50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
3. **PBS-Waschlösung (20x konzentriert), 50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
4. **IgG negative Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. **IgG cut-off Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. **IgG positive Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. **IgM negative Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
8. **IgM cut-off Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
9. **IgM positive Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
10. **IgG-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
11. **IgM-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit FCS und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
12. **Tetramethylbenzidin-Substratlösung (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gebrauchsfertig
13. **Citrat-Stopplösung, 6ml**, enthält ein Säuregemisch

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien

Testkit bei 2-8°C aufbewahren. Die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Etikett vermerkt; Kit-Haltbarkeit siehe Qualitätskontrollzertifikat.

1. Nach Entnahme der benötigten Einzelkavitäten die restlichen Einzelkavitäten/Streifen in verschlossenem Beutel mit Trockenmittel bei 2-8°C lagern. Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder bei 2-8°C lagern.

- Das gebrauchsfertige Konjugat und die TMB Substratlösung sind lichtempfindlich und müssen im Dunkeln aufbewahrt werden. Kommt es durch Lichteinfall zu einer Farbentwicklung der Substratlösung, so ist diese zu verwerfen.
- Nur die für den Testansatz benötigte Menge vom gebrauchsfertigen Konjugat bzw. TMB entnehmen. Zuviel entnommenes Konjugat bzw. TMB darf nicht zurückgeführt werden, sondern ist zu verwerfen.

Material	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Untersuchungsproben	verdünnt	+2 bis +8°C	max. 6h
	unverdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
Kontrollen	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
MTP	nach Öffnen	+2 bis +8° (Lagerung im mitgelieferten Beutel mit Trockenmittelbeutel)	3Monate
RF SorboTech	unverdünnt, nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	verdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3Monate
TMB	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3Monate
Stopplösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
Waschlösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +25°C	4Wochen

6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

- Als Kontrollseren werden nur Seren verwendet, die getestet und als HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK und Hepatitis-B-surface-Antigen negativ befundet wurden. Trotzdem sollten alle Proben, verdünnte Proben, Kontrollen, Konjugate und die Mikrotiterstreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
- Die Komponenten, die Konservierungsmittel enthalten, Citrat-Stopplösung und TMB, wirken reizend auf die Haut, Augen und Schleimhäute. Bei Berührungen die betroffenen Körperstellen sofort unter fließendem Wasser abwaschen und eventuell den Arzt aufsuchen.
- Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

- Aqua dest./demin.
- Mehrkanalpipette 50µl, 100µl
- Mikropipetten: 10µl, 100µl, 1000µl
- Reagenzgläser
- Zellstofftücher
- Abdeckung für ELISA-Platten
- Abfallbehälter für infektiöses Material
- ELISA Handwascher bzw. automatischer Wascher für Mikrotiterplatten
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit 450/620nm Filter (Referenzwellenlänge 620-690nm)
- Brutschrank

8. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für das Erzielen korrekter Ergebnisse.

8.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial kann Serum und Plasma (hierbei ist die Art der Antikoagulanzen nicht von Relevanz) eingesetzt werden, auch wenn in dieser Gebrauchsanweisung nur Serum erwähnt ist.

Patienten-Verdünnungen immer frisch ansetzen.

Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren eingefroren werden. Mehrmaliges Auftauen sollte vermieden werden.

- Nur frische, nicht inaktivierte Seren benutzen.
- Hyperlipämische, hämolytische, mikrobiell kontaminierte Proben und trübe Seren nicht verwenden (falsch positive/negative Ergebnisse).

8.2 Vorbereitung der Reagenzien

Die VIROTECH Diagnostics System Diagnostik bietet ein hohes Maß an Flexibilität durch die Möglichkeit, Verdünnungs- und Waschpuffer, TMB, Citrat-Stopplösung sowie Konjugat parameter- und chargenübergreifend einzusetzen. Die gebrauchsfertigen Kontrollen (positive Kontrolle, cut-off Kontrolle, negative Kontrolle) sind parameterspezifisch und ausschließlich mit der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Plattencharge zu verwenden.

1. Brutschrank auf 37°C einstellen und sich vor Inkubationsbeginn vom Erreichen der Temperatur überzeugen.
2. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen; erst dann die Verpackung mit den Teststreifen öffnen.
3. Alle Flüssigkomponenten vor Gebrauch gut schütteln.
4. Waschlösungs-Konzentrat auf 1Liter mit Aqua dest./demin. auffüllen (bei eventueller Kristallbildung des Konzentrates dieses bitte vor dem Verdünnen auf Raumtemperatur bringen und vor Gebrauch gut schütteln).
5. Hohe IgG-Titer oder Rheumafaktoren können den spezifischen Nachweis von IgM-Antikörpern stören und zu falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen führen. **Für eine korrekte IgM-Bestimmung ist es daher erforderlich, die Seren mit RF-SorboTech (VIROTECH-Adsorptionsmittel) vorzubehandeln.** Bei IgM-Kontrollen entfällt die Voradsorption.

8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung

1. Pro Testansatz 100µl des gebrauchsfertigen Verdünnungspuffers (Leerwert), der negativen, cut-off und der positiven IgG- und IgM-Kontrolle, sowie der verdünnten Patientenseren pipettieren. Wir empfehlen jeweils einen Doppelansatz (Leerwert, Kontrollen und Patientenseren); bei der cut-off Kontrolle ist ein Doppelansatz zwingend notwendig. Arbeitsverdünnung der Patientenseren: 1+100; z.B. 10µl Serum + 1ml Verdünnungspuffer.
2. Nach Pipettierung erfolgt die Inkubation für 30 Min. bei 37 °C (mit Abdeckung).
3. Beenden der Inkubationsperiode durch 4 maliges Waschen mit je 350-400µl Waschlösung pro Kavität. Waschlösung nicht in den Kavitäten stehen lassen, sondern letzte Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf einer Zellstoffunterlage entfernen.
4. 100µl des gebrauchsfertigen Konjugats in alle Kavitäten pipettieren.
5. Inkubation der Konjugate: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung).
6. Beenden der Konjugatinkubation durch 4 maliges Waschen (siehe Pkt. 3).
7. 100µl der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren.
8. Inkubation der Substratlösung: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung, dunkel stellen).
9. Abstoppen der Substratreaktion: in alle Kavitäten je 50µl Citrat-Stopplösung pipettieren. Die Platte vorsichtig und sorgfältig schütteln bis sich die Flüssigkeiten vollständig durchmischt haben und eine einheitliche gelbe Farbe sichtbar wird.
10. Extinktionen bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm) messen. Photometer so einstellen, dass der gemessene Leerwert von allen anderen Extink-tionen abgezogen wird. Die photometrische Messung sollte innerhalb einer Stunde nach Zugabe der Stopplösung durchgeführt werden.

Testablaufschema siehe letzte Seite

8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren

Alle VIROTECH Diagnostics ELISAs können mit Hilfe von ELISA-Prozessoren abgearbeitet werden. Der Anwender ist verpflichtet eine regelmäßige Gerätevalidierung durchzuführen.

VIROTECH Diagnostics empfiehlt die folgende Vorgehensweise:

1. Bei Gerätestellung bzw. größeren Reparaturen Ihres ELISA Prozessors empfiehlt VIROTECH Diagnostics, die Validierung des Gerätes gemäß den Vorgaben des Geräteherstellers vorzunehmen.
2. Es wird empfohlen, anschließend den ELISA Prozessor mit dem Validierungskit (EC250.00) zu überprüfen. Diese regelmäßige Überprüfung mit dem Validierungskit sollte mindestens einmal pro Quartal durchgeführt werden.
3. Bei jedem Testlauf müssen die Freigabekriterien des Qualitätskontrollzertifikates zum Produkt erfüllt werden. Diese Vorgehensweise gewährleistet die einwandfreie Funktion Ihres ELISA Prozessors und dient darüber hinaus der Qualitätssicherung des Labors.

9. Testauswertung

Die gebrauchsfertigen Kontrollen dienen einer semiquantitativen Bestimmung spezifischer IgG- und IgM-Antikörper, deren Konzentration in VIROTECH Einheiten (=VE) angegeben wird. Durch die Testdurchführung bedingte Schwankungen werden über die Berechnungsmethode ausgeglichen und es wird damit eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht. Für die Berechnung der VE werden die Mittelwerte der OD-Werte eingesetzt.

9.1 Testfunktionskontrolle

a) OD-Werte

Der OD-Wert des Leerwertes sollte <0,15 sein

Die OD-Werte der negativen Kontrollen sollten unterhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte, die OD-Werte der positiven Kontrollen sowie der cut-off Kontrollen sollten oberhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte liegen.

b) VIROTECH Einheiten (VE)

Die VIROTECH Einheiten (VE) der cut-off Kontrollen sind mit 10 VE definiert. Die berechneten VE der positiven Kontrollen sollten innerhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereiche liegen.

Werden die Anforderungen (OD-Werte, VE) nicht erfüllt, so ist der Test zu wiederholen.

9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE)

Die Extinktion des Leerwertes (450/620nm) muß von allen Extinktionen abgezogen werden.

$$\begin{aligned} \text{VE (positive Kontrolle)} &= \frac{\text{OD (positive Kontrolle)}}{\text{OD (cut-off Kontrolle)}} \times 10 \\ \text{VE (Patientenserum)} &= \frac{\text{OD (Patientenserum)}}{\text{OD (cut-off Kontrolle)}} \times 10 \end{aligned}$$

9.3 Auswertungsschema IgG und IgM

Ergebnis (VE)	Beurteilung
< 9,0	negativ
9,0 – 11,0	grenzwertig
> 11,0	positiv

1. Liegen die gemessenen VE der Probe oberhalb des grenzwertigen Bereiches, so werden die Proben als positiv betrachtet.
2. Befinden sich die gemessenen VE innerhalb des angegebenen grenzwertigen Bereiches, liegt keine signifikant hohe Antikörperkonzentration vor; die Proben werden als grenzwertig betrachtet. Für den sicheren Nachweis einer Infektion ist es erforderlich, den Antikörpergehalt zweier Serumproben zu bestimmen. Eine Serumprobe sollte direkt nach Beginn der Infektion, eine zweite Probe 5-10 Tage später (rekonvaleszentes Serum) getestet werden. Die Antikörperkonzentration beider Proben muß parallel, d.h. in einem Testansatz bestimmt werden. Eine korrekte Diagnose aufgrund der Bewertung einer einzelnen Serumprobe ist nicht möglich.
3. Liegen die gemessenen Werte unterhalb des definierten grenzwertigen Bereiches, sind keine messbaren antigenspezifischen Antikörper in der Probe vorhanden. Die Proben werden als negativ betrachtet.
4. Bei Vorliegen eines positiven IgM Ergebnisses wird eine Überprüfung des Ergebnisses durch PCR empfohlen.

9.4 Grenzen des Tests

1. Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.
2. Trotz aller Vorzüge des gG2 Assays gibt es auch Hinweise zu den Grenzen des Assays: Einerseits kann die Therapie mit Acyclovir die Antikörperbildung beeinflussen (3) und andererseits kann die genetische Variabilität des gG2 Proteins zu gG2 negativen HSV 2 Stämmen führen.

10. Leistungsdaten

10.1 Diagnostische Sensitivität (Positive Percent Agreement) und Spezifität (Negative Percent Agreement)

HSV 1 (gG1) IgG

Zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität wurden 92 Seren im VIROTECH HSV 1 (gG1) IgG ELISA und einem Referenztest getestet.

VIROTECH HSV 1 (gG1) IgG ELISA	Referenztest			
	negativ	grenzwertig	positiv	Gesamt
negativ	23	8	1	32
grenzwertig	1	6	0	7
positiv	0	2	51	53
Gesamt	24	16	52	92

Bei der Berechnung der Sensitivität und Spezifität wurden die grenzwertigen Seren nicht berücksichtigt.

Sensitivität/PPA = 98%

Spezifität/NPA = 100%

HSV 1 (gG1) IgM

Zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität wurden 88 Seren im VIROTECH HSV 1 (gG1) IgM ELISA und einem Referenztest getestet.

VIROTECH HSV 1 (gG1) IgM ELISA	Referenztest			
	negativ	grenzwertig	positiv	Gesamt
negativ	52	5	14	71
grenzwertig	1	0	1	2
positiv	2	1	12	15
Gesamt	55	6	27	88

Bei der Berechnung der Sensitivität und Spezifität wurden die grenzwertigen Seren nicht berücksichtigt.

Sensitivität/PPA = 46%

Spezifität/NPA = 96%

7 Seren zeigten ein diskrepantes Ergebnis zwischen dem VIROTECH HSV 1 (gG1) IgG/IgM ELISA und dem Referenztest. Diese Seren wurden anschließend nochmals auf einem zweiten Referenztest bestimmt. Von diesen 7 diskrepanten Seren zeigten 5 Seren ein übereinstimmendes negatives Ergebnis mit dem VIROTECH HSV 1 (gG1) IgG/IgM ELISA und 2 Seren ein grenzwertiges Ergebnis.

HSV 2 (gG2) IgG

Zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität wurden 88 Seren im VIROTECH HSV 2 (gG2) IgG ELISA und einem Referenztest getestet.

VIROTECH HSV 2 (gG2) IgG ELISA	Referenztest			
	negativ	grenzwertig	positiv	Gesamt
negativ	58	0	0	58

grenzwertig	6	3	1	10
positiv	3	4	13	20
Gesamt	67	7	14	88

Bei der Berechnung der Sensitivität und Spezifität wurden die grenzwertigen Seren nicht berücksichtigt.

Sensitivität/PPA = 100 %

Spezifität/NPA = 95 %

HSV 2 (gG2) IgM

Zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität wurden 88 Seren im VIROTECH HSV 2 (gG2) IgM ELISA und einem Referenztest getestet.

VIROTECH HSV 2 (gG2) IgM ELISA	Referenztest			
	negativ	grenzwertig	positiv	Gesamt
negativ	72	0	1	73
grenzwertig	2	0	3	5
positiv	4	0	6	10
Gesamt	78	0	10	88

Bei der Berechnung der Sensitivität und Spezifität wurden die grenzwertigen Seren nicht berücksichtigt.

Sensitivität/PPA = 86 %

Spezifität/NPA = 95 %

10.2 Durchseuchung (erwartete Werte)

HSV 1 (gG1)

IgG/IgM

Zur Ermittlung der in der Literatur (15) beschriebenen 70% Durchseuchung im IgG und 0% Durchseuchung im IgM im Erwachsenenalter wurden 78 Blutspenderseren (Blutspenderpanel Frankfurt a.M., Hessen) getestet.

Serenkollektiv (n=78)	VIROTECH HSV 1 (gG1) IgG/IgM ELISA	
	IgG	IgM
Positiv	55	1
Grenzwertig	5	2
Negativ	18	75
Durchseuchung in %	70,5	1,3

HSV 2 (gG2)

IgG/IgM

Zur Ermittlung der in der Literatur (8) beschriebenen 9,6% Durchseuchung im IgG und 0% Durchseuchung im IgM im Erwachsenenalter wurden 80 Blutspenderseren (Blutspenderpanel Frankfurt a.M., Hessen) getestet.

Serenkollektiv (n=80)	VIROTECH HSV 2 (gG2) IgG/IgM ELISA	
	IgG	IgM
Positiv	3	2
Grenzwertig	0	0
Negativ	77	78
Durchseuchung in %	3,8	2,5

10.3 Interferente Substanzen

HSV 1 (gG1)

IgG/IgM

Pathologische Werte der Substanzen Hämoglobin, Bilirubin, Cholesterol und Triglyceride haben keinen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit des VIROTECH HSV1 (gG1) IgG/IgM ELISA.

HSV 2 (gG2)

IgG/IgM

Pathologische Werte der Substanzen Hämoglobin, Bilirubin, Cholesterol und Triglyceride haben keinen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit des VIROTECH HSV2 (gG2) IgG/IgM ELISA.

10.4 Kreuzreaktivität

a) HSV 1 (gG1)

IgG: Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität des VIROTECH HSV 1 (gG1) ELISA im IgG wurden 200 vorcharakterisierte Patientenseren getestet, die für einen der in der Tabelle gelisteten Erreger positiv waren. Seren, welche im VIROTECH HSV 1 (gG1) ELISA ein positives Testergebnis ergaben, wurden anschließend zusätzlich mit einem ELISA eines anderen Anbieters getestet.

Erreger	Anzahl getestet	neg	gw	pos	Positive Ergebnisse bestätigt durch einen anderen Testanbieter (ELISA)
Candida albicans	12	0	0	12	Ja
Chlamydia trachomatis	10	3	1	6	teilweise
CMV	15	2	0	13	teilweise
EBV	15	3	1	11	Ja
HPV	7	1	0	6	teilweise
HSV-2	9	3	0	6	Ja
Masern Virus	15	4	1	10	Ja
Parainfluenza Virus	15	3	1	11	Ja
Rubella Virus	14	2	0	12	teilweise
Toxoplasma gondii	13	3	0	10	teilweise
Treponema pallidum	15	0	0	15	teilweise
VZV	15	4	1	10	Ja
Anti Nuclear Antibodies	15	0	1	14	teilweise
Schwangerschaft	15	3	0	12	teilweise
Rheumafaktor	15	3	0	12	teilweise

Aufgrund fehlenden Probenmaterials konnte eine mögliche Kreuzreaktion mit dem Erreger Neisseria gonorrhea nicht überprüft werden.

IgM: Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität des VIROTECH HSV 1 (gG1) ELISA im IgM wurden 163 vorcharakterisierte Patientenseren getestet, die für einen der in der Tabelle gelisteten Erreger positiv waren. Seren, welche im VIROTECH HSV 1 (gG1) ELISA ein positives Testergebnis ergaben, wurden anschließend zusätzlich mit einem ELISA eines anderen Testanbieters getestet.

Erreger	Anzahl getestet	neg	gw	pos	Positive Ergebnisse bestätigt durch einen anderen Testanbieter (ELISA)
Candida albicans	15	10	2	3	Nein
Chlamydia trachomatis	8	5	1	2	Nein
CMV	15	13	0	2	teilweise
EBV	15	5	2	8	teilweise
HSV-2	5	4	1	0	teilweise
Masern Virus	14	11	1	2	Nein
Parainfluenza Virus	9	9	0	0	teilweise
Rubella Virus	4	4	0	0	teilweise
Toxoplasma gondii	11	8	0	3	Nein
Treponema pallidum	15	12	1	2	Nein
VZV	7	5	0	2	teilweise
Anti Nuclear Antibodies	15	14	1	0	teilweise
Schwangerschaft	15	14	0	1	Ja
Rheumafaktor	15	15	0	0	teilweise

Aufgrund fehlenden Probenmaterials konnte eine mögliche Kreuzreaktion mit dem Erreger Neisseria gonorrhea nicht überprüft werden.

b) HSV 2 (gG2)

IgG: Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität des VIROTECH HSV 2 (gG2) ELISA im IgG wurden 34 vorcharakterisierte Patientenseren getestet, die für einen der in der Tabelle gelisteten Erreger positiv waren.

Erreger	Anzahl getestet	neg	gw	pos
VZV	5	4	1	0
Masern Virus	8	8	0	0
CMV	10	10	0	0
EBV	9	9	0	0
Parvovirus	2	2	0	0

Im VIROTECH HSV 2 (gG2) ELISA ist keines der getesteten Seren positiv.

IgM: Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität des VIROTECH HSV 2 (gG2) ELISA im IgM wurden 22 vorcharakterisierte Patientenseren getestet, die für einen der in der Tabelle gelisteten Erreger positiv waren.

Erreger	Anzahl getestet	neg	gw	pos
VZV	5	4	1	0
Masern Virus	4	3	1	0
CMV	6	4	0	2
EBV	5	5	0	0
Parvovirus	2	2	0	0

IgM: Im VIROTECH HSV 2 (gG2) ELISA sind 2 CMV Seren IgM positiv.

10.5 Messbereich

a) VIROTECH HSV 1 (gG1) IgG/IgM ELISA

10.5.1 Limit of Blank (LoB)

Für die Berechnung des LoB gemäß der CLSI Guideline EP17-A2 wurden insgesamt 4 negative Seren auf 2 Chargen an 5 Tagen in Dreifachbestimmung getestet.

Der ermittelte LoB für IgG liegt bei einem OD-Wert von 0,078.

Der ermittelte LoB für IgM liegt bei einem OD-Wert von 0,054.

10.5.2 Limit of Detection (LoD)

Für die Berechnung des LoD gemäß der CLSI Guideline EP17-A2 wurden insgesamt 4 schwach positive Seren an 4 Tagen auf 2 Chargen in Vierfachbestimmung getestet.

Der ermittelte LoD für IgG liegt bei einem OD-Wert von 0,086.

Der ermittelte LoD für IgM liegt bei einem OD-Wert von 0,070.

b) Messbereich VIROTECH HSV 2 (gG2) IgG/IgM ELISA

n/a

10.6 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)

HSV 1 (gG1)

In einem Assay wurden Streifen verschiedener Platten einer Charge mit 2 Seren schachbrettartig getestet. Der so ermittelte Variationskoeffizient für HSV 1 (gG1) beträgt < 12%.

HSV 2 (gG2)

In einem Assay wurden Streifen verschiedener Platten einer Charge mit 2 Seren schachbrettartig getestet. Der so ermittelte Variationskoeffizient für HSV 2 (gG2) beträgt < 15%.

10.7 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)

HSV 1 (gG1)

Für die Bestimmung der Vergleichspräzision wurden 10 Seren von 3 Personen an 3 unterschiedlichen Tagen ausgewertet und der VK der VE Werte betrachtet. Der so ermittelte Variationskoeffizient für HSV 1 (gG1) beträgt ≤ 20%.

HSV 2 (gG2)

Für die Bestimmung der Vergleichspräzision wurden 7 Seren von 3 Personen an 3 unterschiedlichen Tagen ausgewertet und der VK der VE Werte betrachtet. Der so ermittelte Variationskoeffizient für HSV 2 (gG2) beträgt ≤ 20%.

11. Literatur

1. Anzivino, E, D Fioriti, M Mischitelli, A Bellizzi, V Barucca, F Chiarini, V Pietropaolo. 2009. Herpes simplex virus infection in pregnancy and in neonate: status of art of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention. Virol J. 6,40
2. Arvin, A, C Prober. 1995. Herpes Simplex Viruses. 876-883. In Murray, P, E Baron, M Pfaller, F Tenover, and R Tenover (eds.). Manual of Clinical Microbiology. 6th Ed. ASM, Washington, D.C.
3. Bernstein, DI, LR Stanberry, CJ Harrison, JC Kappes, MG Myers. 1986. Antibody response, recurrence patterns and subsequent herpes simplex virus type 2 (HSV-2) re-infection following initial HSV-2 infection of guinea-pigs: effects of acyclovir. J Gen Virol. 67, 1601-1612
4. Brown ZA, Benedetti J, Ashley R, Burchett S, Selke S, Berry S, Vontver LA, Corey L.. 1991. Neonatal herpes simplex virus infection in relation to asymptomatic maternal infection at the time of labor. N Engl J Med. 324, 1247-1252

5. Brown, Z , S Sleke, J Zeh, J Kopelmann, A Maslow, R Ashley, D Watts, S Berry, M Herd, L Correy. 1997. The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy. *N Engl J Med.* 337, 509-515
6. Bünzli, D, Wietlisbach V, Barazzoni F, Sahli R, Meylan PR. 2004. Seroepidemiology of Herpes Simplex virus type 1 and 2 in Western and Southern Switzerland in adults aged 25–74 in 1992–93 : a population-based study. *BMC Infect Dis.* 4. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/4/10>
7. CDC. 1998. Guidelines for Treatment of Sexually Transmitted Diseases. *MMWR.* 47, 1-118
8. Gerit Korr, Michael Thamm, Irina Czogiel, Christina Poethko-Mueller, Viviane Bremer and Klaus Jansen. 2017. Decreasing seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Germany leaves many people susceptible to genital infection: time to raise awareness and enhance control. Korr et al. *BMC Infectious Diseases* (2017) 17:471
9. Prober, C, W Sullender, L Yasukawa, D Au, A Yaeger, A Arvin. 1987. Low risk if herpes simplex virus infections in neonates exposed to the virus at the time of vaginal delivery to mothers with recurrent herpes simplex virus infections. *N Engl J Med.* 316, 240-244
10. Rabenau HF, Buxbaum S, Preiser W, Weber B, Doerr HW. 2002. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and type 2 in the Frankfurt am Main area, Germany. *Med Microbiol Immunol.* 190, 153-160
11. Roizman, B, DM Knipe. 2001. Herpes Simplex Viruses and Their Replication. . In Fields, B, D Knipe, P Howley, et al. (eds.). *Fields Virology 4th Ed.* Lippincott-Raven, Philadelphia
12. Smith J, N Robinson. 2002, Age-specific prevalence of infection with herpes simplex : a global review. *J Inf Dis.* 186, 3-28
13. Tunbäck, P, Bergström T, Claesson BA, Carlsson RM, Löwhagen GB. 2007. Early acquisition of herpes simplex virus type 1 antibodies in children-A longitudinal serological study. *J Clin Vir.* 40, 26-30
14. Whitley, R. 2001. Herpes Simplex Viruses. In Fields, B, D Knipe, P Howley, et al. (eds.). *Fields Virology 4th Ed.* Lippincott-Raven, Philadelphia
15. Wutzler, P, Doerr HW, Färber I, Eichhorn U, Helbig B, Sauerbrei A, Brandstädt A, Rabenau HF. 2000. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in selected German populations - relevance for the incidence of genital herpes. *J Med Virol.* 61, 201-207
16. Sauerbrei A. 2016. Herpes Genitalis: Diagnosis, treatment and Prevention. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2016 Dec;76(12):1310-1317. doi: 10.1055/s-0042-116494. Epub 2016 Oct 18. Review.

Vorbereitung der Patientenproben und Waschlösung

▼ **Waschlösung:** Konzentrat auf 1 Liter mit aqua dest./demin. auffüllen

▼ **IgG-Proben – Verdünnung**
1:101

z.B.:
10 µl Serum/Plasma + 1000 µl Verdünnungspuffer
(Serumverdünnungspuffer ist gebrauchsfertig)

▼ **IgM-Proben - Verdünnung**
1:101

Rheumafaktoradsorption mit RF-SorboTech

z.B.:
5 µl Serum/Plasma + 450 µl Verdünnungspuffer +
1 Tropfen RF-SorboTech bei RT 15 min inkubieren

Testdurchführung

