

VIROTECH HSV IgG LINE Immunoblot

(HSV IgG LINE-16)

Bestell-Nr.: WE130G16

(HSV IgG LINE-32)

Bestell-Nr.: WE130G32

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

**VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

**Tel.: +49-6142-6909-0
Fax: +49-6142-966613
<http://www.virotechdiagnostics.com>**



Freigabedatum: 18.10.2018

REV 20 / VIROTECH HSV IgG LINE Immunoblot DE

Inhalt

1. Verwendungszweck	3
2. Diagnostische Bedeutung.....	3
3. Testprinzip.....	3
4. Packungsinhalt.....	4
4.1 Kit für 16 Bestimmungen	4
4.2 Kit für 32 Bestimmungen	4
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	5
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)	5
8. Untersuchungsmaterial.....	5
9. Testdurchführung	5
9.1 Vorbereitung der Proben	5
9.2 Vorbereitung der Reagenzien	6
9.3 Immunoblot Testdurchführung	6
9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren.....	7
10. Testauswertung.....	7
10.1 Auswertung der Patientenproben	7
10.2 Einsatz der Cut off Kontrolle	7
10.3 Bedeutung der Antigene.....	7
10.4 Auswertungskriterien	8
10.5 Grenzen des Tests	8
11. Leistungsdaten.....	8
11.1 Sensitivität und Spezifität im Vergleich zum Western Blot	8
11.2 Sensitivität und Spezifität im Vergleich zum ELISA	9
11.3 Diagnostische Sensitivität und Spezifität.....	9
11.4 Kreuzreaktivität	10
11.5 Durchseuchung (erwartete Werte).....	10
11.6 Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit)	10
11.7 Inter-Assay-Präzision (Reproduzierbarkeit)	10
12. Literatur	11
13. Testablaufschema	12

1. Verwendungszweck

LINE Immunoblot Testkit zum qualitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen Herpes simplex Virus (HSV) 1 und HSV2 im Humanserum. Durch die Verwendung der subtypenspezifischen Glycoproteine G1 (gG1) und G2 (gG2) ist die diagnostisch bedeutsame Unterscheidung von HSV1 und HSV2 möglich.

2. Diagnostische Bedeutung

Herpes-simplex-Viren (HSV) sind in der Bevölkerung weit verbreitet. Sie werden durch engen körperlichen Kontakt über die Schleimhäute übertragen, sodaß die Durchseuchung meist schon im frühen Kindesalter einsetzt. Obwohl diese 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 HSV1-Infektionen während im Genitalbereich die Infektionen überwiegend durch HSV2 hervorgerufen werden, nur ein geringer Teil (5-30%) wird durch HSV1 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 HSV2-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, *sdass 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 HSV1 und HSV2 sind die serologischen Verfahren, die Viruslysate als Antigene benutzen, nicht ausreichend geeignet, HSV1- von HSV2-Infektionen zu unterscheiden. Aufgrund der hohen Durchseuchung mit HSV1 kann der serologische Status für HSV2 mit solchen Verfahren nur schwer zuverlässig bestimmt werden.

Die genitalen HSV1- Infektionen rezidivieren wesentlich seltener als HSV2- Infektionen. Eine vorausgegangene genitale Infektion mit HSV1 scheint einen gewissen Schutz vor Infektion mit HSV2 zu bieten, bzw. die Symptome zu mildern oder gänzlich zu verhindern (10). Eine vorausgegangene orale HSV1- Infektion stellt keinen Schutz gegen eine genitale HSV2 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). Die Differenzierung der HSV1- von der HSV2- Infektion ist somit für die Bestimmung der Durchseuchung mit HSV1 bzw. HSV2 und damit zur Identifizierung von potentiellen Überträgern und insbesondere zur Risikoeinschätzung und Vorbeugung beim Herpes neonatorum von Bedeutung.

3. Testprinzip

Proteine des Erreger-Antigens werden durch ein spezielles Sprühverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Nitrozellulosemembran wird dann in Einzelstreifen geschnitten.

Die Inkubation der antigentragenden Nitrozellulosestreifen mit Humanserum/-plasma-Proben erlaubt den Nachweis vorhandener spezifischer Antikörper. Diese Antikörper bilden Immunkomplexe mit dem auf den Teststreifen fixierten Antigenen. Nach Entfernung der nicht gebundenen Antikörper durch Waschschriffe, werden die einzelnen Nitrozellulosestreifen mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-human IgG-Antikörpern inkubiert. Nachdem nicht gebundene konjugierte Antikörper durch einen weiteren Waschschriff entfernt wurden, erfolgt die Sichtbarmachung der Antigen/Antikörper-Komplexe (der gebundenen Antikörper) durch die Zugabe eines ungefärbten Substrates, welches bei seiner enzymatischen Umsetzung blau-violette

Banden (%Antigen-Banden+) erzeugt. Die Enzym/Substrat-Reaktion wird durch Waschen der Nitrozellulosestreifen mit Aqua dest./deionisiert gestoppt. Abhängig von dem beobachteten Bandenmuster kann man auf das Vorhandensein von spezifischen IgG-Antikörpern schließen.

4. Packungsinhalt

4.1 Kit für 16 Bestimmungen

- | | | |
|--|-----------|-------------|
| 1. IgG Nitrozellulose Teststreifen mit aufgesprützten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig | 1x | 16 Streifen |
| 2. IgG Cut off Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt | 1x | 1,0 ml |
| 3. Verdünnungs-/Waschpuffer , pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel | 1x | 50 ml |
| 4. IgG-Konjugat (100x konz.)
Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel | 1x | 0,7 ml |
| 5. Substrat (BCIP/NBT), gebrauchsfertig | 1x | 57 ml |
| 6. Auswertungsprotokollblatt zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse | 1x | 1 Stk. |

4.2 Kit für 32 Bestimmungen

- | | | |
|--|-----------|-------------|
| 1. IgG Nitrozellulose Teststreifen mit aufgesprützten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig | 2x | 16 Streifen |
| 2. IgG Cut off Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt | 1x | 1,0 ml |
| 3. Verdünnungs-/Waschpuffer , pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel | 2x | 50 ml |
| 4. IgG-Konjugat (100x konz.)
Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel | 1x | 0,7 ml |
| 5. Substrat (BCIP/NBT), gebrauchsfertig | 1x | 57 ml |
| 6. Auswertungsprotokollblatt zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse | 1x | 1 Stk. |

Auf Anfrage zusätzlich erhältlich:

IgG -Positive Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt, 0,5 ml.

Die positiven Banden > Cut off Bande können sie dem mitgelieferten Zertifikat entnehmen.
(Best.-Nr.: IgG: WE130P60)

IgG -Negative Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt, 0,5 ml.

Die negative Kontrolle zeigt keine Banden bzw. keine für die Auswertung relevanten Banden > Cut off Bande.
(Best.-Nr.: IgG: WE130N60)

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien

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

- Die einzelnen Reagenzien nicht einfrieren und keinen hohen Temperaturen aussetzen.
- Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Lagerung der Reagenzien bei grellem Licht ist zu vermeiden.
- Die BCIP/ NBT-Substratlösung ist lichtempfindlich und muss im Dunkeln aufbewahrt werden.
- Nitrozellulose Teststreifen:** Streifen nach der Entnahme aus dem Beutel sofort verwenden. Beutel mit den nicht benötigten Streifen wieder fest verschließen und bei 2-8°C aufbewahren. Zur Archivierung der Ergebnisse sollten die Nitrozellulose Teststreifen unbedingt vor direktem Sonnenlicht geschützt werden, um ein Verblässen der Banden zu vermeiden.

Material	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Untersuchungsproben	unverdünnt	+2 bis +8°C	1 Woche
Teststreifen	nach Öffnen	+2 bis +8°C (Lagerung im mitgelieferten Beutel)	3 Monate
Kontrollen	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate

Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate
	verdünnt	+2 bis +8°C	ca. 6h
Substrat	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate
Waschlösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +8°C	4 Wochen
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	oder Raumtemperatur	2 Wochen

6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

1. 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 Kontrollseren, Proben, verdünnte Proben, Konjugate und die Nitrozellulose Teststreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
2. Bei der Durchführung des Immunoblots sind Einmalhandschuhe zu tragen und eine Plastik-Pinzette zu benutzen.
3. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.
4. Die Inkubationswannen sind vom Hersteller nur für den Einmalgebrauch konzipiert. Ein mehrmaliger Gebrauch der Inkubationswannen liegt in der Verantwortung des Anwenders. Bei evtl. Mehrfachverwendung empfehlen wir, die Inkubationswannen nach Gebrauch mehrere Stunden in 1% Natriumhypochloritlösung zu desinfizieren, zu reinigen und gründlich mit Leitungswasser und Aqua dest./deionisiert zu spülen.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

1. Inkubationswanne (bei Bedarf erhältlich unter Best.-Nr. WE300.08)
2. Schüttler (vertikal nicht zentrifugal)
3. Eine Spritzflasche zum Abstopfen
4. Pipette oder Handwaschgerät
5. Mikropipetten 5 µl - 1500 µl
6. Pipettenspitzen
7. Probenröhrchen (Tubes) 2-20 ml Volumen
8. Plastikpinzette
9. Aqua dest. oder deionisiert
10. Filterpapier

8. Untersuchungsmaterial

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

9. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für die Erzielung korrekter Ergebnisse.

9.1 Vorbereitung der Proben

1. Pro Patientenprobe werden 15 µl Serum oder Plasma benötigt.
2. Blutproben sollten aseptisch durch Venenpunktion entnommen werden. Nach vollständiger Gerinnung ist das Serum abzutrennen (entfällt bei Plasma). Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren bei -20°C eingefroren werden.
3. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Seren ist zu vermeiden.
4. Seren, die hitzeinaktiviert, lipämisch, hämolytisch oder mikrobiell kontaminiert sind, können zu verfälschten Ergebnissen führen und sollten daher nicht verwendet werden.
5. Getrübbte Serumproben (insbesondere nach dem Auftauen) nicht verwenden, ggf. zentrifugieren (5 min bei 1000 x g), klaren Überstand pipettieren und im Test einsetzen.

9.2 Vorbereitung der Reagenzien

6. Zur Anpassung an die Laborroutine, können alle LINEs und EcoBlots in einem Testlauf mit gleichen Inkubationszeiten und parameter- / chargenübergreifenden Komponenten abgearbeitet werden. Die Cut off Kontrollen werden parameter- und chargenspezifisch eingesetzt.
7. Vor Verdünnung aller Testreagenzien das jeweilige Konzentrat auf Raumtemperatur bringen. Nur Aqua dest./deionisiert von hoher Qualität und Raumtemperatur verwenden.
8. Verdünnungen vor Testansatz gut durchmischen.
9. **Verdünnungs-/Waschpuffer**
Der Verdünnungs-/ Waschpuffer liegt 10-fach konzentriert vor. Das Verdünnungs-/ Waschpufferkonzentrat 1:10 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen (10ml/50ml/100ml Konzentrat + 90ml/450ml/900ml A. dest./deionisiert), gut mischen.
Sowohl der konzentrierte als auch der verdünnte Verdünnungs-/ Waschpuffer können eventuell eine Gelbfärbung aufweisen. Diese Gelbfärbung hat weder Einfluss auf die Haltbarkeit des Verdünnungs-/ Waschpuffers, noch auf die Funktionalität und diagnostische Aussagekraft des Testansatzes.
10. **IgG-Konjugat**
Das Konjugat 1 + 100 mit endverdünntem Verdünnungs-/Waschpuffer verdünnen, gut mischen. Pro Serumprobe wird 1,5ml Konjugat-Gebrauchslösung benötigt. Siehe Konjugatverdünnungstabelle (Punkt: sTestablaufschema%).
11. **Substratlösung**
Die Substratlösung wird gebrauchsfertig geliefert.

9.3 Immunoblot Testdurchführung

Achtung: Für die korrekte Durchführung und Beurteilung des HSV LINEs, muß bei jedem Testansatz eine parameter- und chargenspezifische Cut off Kontrolle mitgeführt werden.

1. Die Testdurchführung erfolgt bei Raumtemperatur.
2. Für jede Probe je 1 Streifen in die Rinne einer sauberen Inkubationswanne legen. Streifen möglichst nur am markierten oberen Ende anfassen.
3. Je 1,5ml gebrauchsfertigen **Verdünnungs-/Waschpuffer** pipettieren und auf den Schüttler stellen. Darauf achten, dass die Nitrozellulose Teststreifen gleichmäßig mit Flüssigkeit bedeckt sind, die Streifen dürfen während der gesamten Testdurchführung nicht trocknen.
4. Die verstärkten Nitrozellulose Teststreifen sind innerhalb einer Minute vollständig befeuchtet und können in Rücken-, Bauch- oder Seitenlage inkubiert werden.
5. Je **15µl Patientenserum/-plasma** bzw. **100µl der Cut off / Positiven / Negativen Kontrolle** zupipettieren, möglichst am oberen, markierten Streifenende. Patientenserum und Kontrolle **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Beim Pipettieren und anschließendem Abgießen darauf achten, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination der einzelnen Patientenproben kommt.
6. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen, oder vorsichtig abgießen. Beim Abgießen der Flüssigkeit bleiben die Nitrozellulose Teststreifen am Boden der Rinnen haften. Restflüssigkeit auf einem Saugpapier abtropfen.
7. Streifen **Waschen:** mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Vor Ablauf des letzten Waschschrilles die benötigte Menge an frischer Konjugatverdünnung (s. Tabelle) herstellen.
8. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
9. Je 1,5 ml der hergestellten **Konjugatverdünnung** in die entsprechenden Inkubationsrinnen pipettieren und **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren.
10. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen.
11. Streifen **Waschen:** mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Anschließend **1 x 1 Minute** mit **Aqua dest./deionisiert** spülen.
12. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
13. Je 1,5 ml gebrauchsfertige **Substratlösung** in die Rinnen pipettieren und **10 ± 3 Minuten** auf dem Schüttler entwickeln.

14. Farbentwicklung **stoppen** durch Abgießen der Substratlösung. Anschließend Streifen ohne Zwischeninkubation **3 x** mit je 1,5 ml **Aqua dest./deionisiert** waschen.
15. Aqua dest./deionisiert abgießen und Streifen auf einem sauberen saugfähigen Papier trocknen. Die Hintergrundfärbung, die bei feuchten Nitrozellulose Teststreifen beobachtet werden kann, geht bei den getrockneten Streifen vollständig zurück. Verstärkte Nitrozellulose Teststreifen benötigen im Vergleich zu den herkömmlichen Nitrozellulose Teststreifen etwas länger, bis sie getrocknet sind.
16. Zur Auswertung das beigefügte Auswertungsprotokoll verwenden. Die Beschriftung der hochspezifischen Banden auf dem Protokollblatt erleichtert Ihnen die Auswertung der Patientenproben.

Testablaufschema siehe letzte Seite

9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren

Für die automatisierte Abarbeitung der Blots und LINEs sind folgende Geräte validiert: Apollo und Profiblot. Grundsätzlich sind alle handelsüblichen Blotautomaten geeignet.

10. Testauswertung

Zur sicheren Auswertung ist jeder LINE Streifen mit zwei Kontrollen ausgestattet:

1. **Serumkontrolle** (= serum control):

Nur nach Inkubation mit Patientenserum erscheint unterhalb der Markierungslinie (= markline) die Seruminkubationsbande.

2. **Konjugatkontrolle** (= conjugate control):

Der LINE Streifen ist mit einer Konjugatkontrollbande ausgestattet, die nach Inkubation mit dem entsprechenden Konjugat erscheint.

Die Testdurchführung ist gültig, wenn auf dem entwickelten Nitrozellulose Teststreifen sowohl die Serumkontrolle als auch die interne Konjugatkontrolle deutlich zu erkennen ist.

Die Position der Serum- / und der Konjugatkontrollbande entnehmen Sie dem Protokollblatt.

10.1 Auswertung der Patientenproben

Die Position und Bezeichnung der reaktiven Banden entnehmen Sie bitte dem Protokollblatt.

IgG-Banden: HSV, gG1, gG2

10.2 Einsatz der Cut off Kontrolle

Cut off Bande zur Beurteilung der HSV Gesamt-Antigen-, gG1- und gG2-Banden: gG2-Bande der Cut off Kontrolle

Bewertung der Bandenintensitäten:

- | | | |
|--------------------------------|---|------------------|
| 17. <u>gG1- und gG2-Bande:</u> | Banden < gG2-Bande der Cut off Kontrolle: | Negativ (-) |
| | Banden = gG2-Bande der Cut off Kontrolle: | Grenzwertig (gw) |
| | Banden > gG2-Bande der Cut off Kontrolle: | Positiv (+) |
| 18. <u>HSV-Gesamt-Antigen:</u> | Banden < gG2-Bande der Cut off Kontrolle: | Negativ (-) |
| | Banden × gG2-Bande der Cut off Kontrolle: | Positiv (+) |

10.3 Bedeutung der Antigene

Antigen / Bezeichnung	Beschreibung der Antigene	Spezifität der Antikörper im LINE
HSV- Gesamtantigen	Natives HSV1- und HSV2-Gesamtantigen.	spezifisch
gG1	Rekombinantes, speziesspezifisches Glykoprotein aus Baculovirus-System.	Hochspezifisch für HSV1
gG2	Affinitätschromatographisch gereinigtes speziesspezifisches Glykoprotein.	Hochspezifisch für HSV2

10.4 Auswertungskriterien

Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.

Empfohlene Beurteilung

Falls nur die HSV Gesamtantigenbande, nur die gG1- oder nur die gG2-Bande erkannt wird, ist das Ergebnis als unplausibel zu bewerten und sollte mittels einer anderen Methodik verifiziert werden.

Bandenbewertung			Gesamt-Beurteilung	
HSV Gesamtantigen	gG1	gG2	HSV-1	HSV-2
-	-	-	negativ	negativ
Nur eine isolierte Bande			unplausibel	unplausibel
+	gw	-	grenzwertig	negativ
+	-	gw	negativ	grenzwertig
+	gw	gw	grenzwertig	grenzwertig
+	+	-	positiv	negativ
+	-	+	negativ	positiv
+	gw	+	grenzwertig	positiv
+	+	gw	positiv	grenzwertig
+	+	+	positiv	positiv

10.5 Grenzen des Tests

- Ein negatives Blotergebnis schließt die Möglichkeit einer Infektion mit HSV1 und/oder HSV2 nicht vollständig aus. Die Probe kann vor Auftreten der Antikörper entnommen worden sein oder der Antikörpertiter liegt unter der Nachweisgrenze des Tests. In diesen Fällen wird eine IgM-Serologie empfohlen.
- Die Therapie mit Acyclovir kann die Antikörperbildung beeinflussen (3).
- Die genetische Variabilität des gG2 Proteins kann zu gG2 negativen HSV2 Stämmen führen.
- In seltenen Fällen können Patientenserum %inverse+Banden zeigen (dunkler Hintergrund, weiße Banden); diese sind nicht zu bewerten, d.h. der Immunoblot ist in diesen Fällen nicht auswertbar. Das Serum sollte mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

11. Leistungsdaten

11.1 Sensitivität und Spezifität im Vergleich zum Western Blot

Zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität wurden folgende Serenkollektive untersucht:

Prostituierte (n=30), Kinder (n=10), Autoimmunseren (n=3), Seren mit Verdacht auf HSV-Infektion (n= 82).

Als Referenzmethoden (Befund) wurde ein Western Blot durchgeführt.

Serenkollektiv (n = 125) 5 unklare Seren		VIROTECH HSV IgG LINE Immunoblot	
		HSV1 negativ	HSV1 positiv
Befund (Western Blot)	HSV1 negativ	41	3
	HSV1 positiv	4	72

Serenkollektiv (n = 125) 3 unklare Seren		VIROTECH HSV IgG LINE Immunoblot	
		HSV2 negativ	HSV2 positiv
Befund	HSV2 negativ	37	2

(Western Blot)	HSV2 positiv	7	76
-----------------------	---------------------	---	----

Daraus errechnet sich folgende Sensitivität / Spezifität:

	HSV1	HSV2
Sensitivität:	94,7 %	91,6 %
Spezifität:	93,2 %	94,9 %

11.2 Sensitivität und Spezifität im Vergleich zum ELISA

Zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität wurden folgende Serenkollektive untersucht:

Prostituierte (n=30), Schwangere (n=74/75), Kinder (n=58), Blutspender (n=69), Autoimmunseren (n=14), Ringversuchsseren (n=20), HIV-Seren (n=76), Potentiell kreuzreaktive Seren (n=18), Seren mit Verdacht auf HSV-Infektion (n= 82).

Als Referenzmethoden (Befund) wurde ein ELISA durchgeführt.

Serenkollektiv (n = 441) 24 unklare Seren		VIROTECH HSV IgG LINE Immunoblot	
		HSV1 negativ	HSV1 positiv
Befund (ELISA)	HSV1 negativ	120	6
	HSV1 positiv	8	283

Serenkollektiv (n = 442) 13 unklare Seren		VIROTECH HSV IgG LINE Immunoblot	
		HSV2 negativ	HSV2 positiv
Befund (ELISA)	HSV2 negativ	282	6
	HSV2 positiv	6	135

Daraus errechnet sich folgende Sensitivität / Spezifität:

	HSV1	HSV2
Sensitivität:	97,3%	95,7 %
Spezifität:	95,2 %	97,9 %

11.3 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

52 bzw. 53 klinisch definierte HSV-Seren wurden zur Bestimmung der diagnostische Sensitivität und Spezifität herangezogen.

Serenkollektiv (n = 53) 3 unklare Seren		VIROTECH HSV IgG LINE Immunoblot	
		HSV1 negativ	HSV1 positiv
Diagnostischer Befund	HSV1 negativ	16	0
	HSV1 positiv	2	32

Serenkollektiv (n = 52) 1 unklares Serum		VIROTECH HSV IgG LINE Immunoblot	
		HSV2 negativ	HSV2 positiv
Diagnostischer Befund	HSV2 negativ	10	0
	HSV2 positiv	3	38

Daraus errechnet sich folgende diagnostische Sensitivität / Spezifität:

	HSV-1	HSV-2
Diagnostische Sensitivität:	94,1 %	92,7 %
Diagnostische Spezifität:	100,0 %	100,0 %

Die etwas geringere diagnostische Sensitivität im Vergleich zur Sensitivität, lässt sich durch das Serenpanel erklären. Da es sich bei diesen Seren auch um primäre Infektionen handelt, kann es sein, dass die IgG-Antikörperbildung noch nicht in jedem Fall stattgefunden hat!

11.4 Kreuzreaktivität

Das eingesetzte gereinigte native gG2- und das gereinigte rekombinante gG1- Protein sind hochspezifisch.

11.5 Durchseuchung (erwartete Werte)

In den nachfolgenden Tabellen sind die mit den VIROTECH Diagnostics ermittelten Ergebnisse für bestimmte Seren-Kollektive dargestellt. Die Ergebnisse zeigen eine gute Korrelation mit den in der Literatur beschriebenen epidemiologischen Daten.

Serenkollektiv (HSV1/HSV2)	HSV LINE HSV1 positiv	Literaturangaben HSV1	HSV LINE HSV2 positiv	Literaturangaben HSV2
Blutspender (n= 69)	78,3 %	80% in Deutschland (15) 75% in Deutschland (10) 80% in der Schweiz (6)	8,7 %	15% in Deutschland (15) 14-18% in Deutschland (10) 19% in der Schweiz (6)
Schwangere (n=79/78)	79,7 %	70% in den Niederlanden (13)	6,4 %	-
Kinderseren (n=85/82)	28,0 %	30% : 1-5 Jährige 50% : 12-16 Jährige (12)	0%	1-5 Jahre < 2% 6-11 Jahre < 3% 11-16 Jahre ca. 8% (12)
Prostituierte (n=35/35)	85,7 %	-	71,4 %	78% in Deutschland (10) 49% in der Schweiz (8)
HIV Seren (n= 76/76)	88,2 %	91% in Deutschland (15)	71,1 %	60% (10)

Die Daten stimmen mit den Literaturangaben gut überein; dies ist ein Hinweis für die gute Spezifität und Sensitivität des Tests.

11.6 Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit)

Für die Ermittlung der Wiederholbarkeit wurden in einem Versuchsansatz 32 Nitrozellulose Teststreifen einer ungeschnittenen Nitrozellulosemembran mit der cut-off Kontrolle und in einem zweiten Versuchsansatz mit der positiven Kontrolle inkubiert. Die Banden zeigen auf dem gesamten Nitrozellulose-Sheet einheitliche Intensitäten.

11.7 Inter-Assay-Präzision (Reproduzierbarkeit)

Die Bestimmung der Testpräzision erfolgte in 10 unabhängigen Testansätzen mittels manueller Testung und Automatentestung von unterschiedlichen Personen.

Es wurde für HSV1 ein negatives Serum, ein schwach-positives Serum und positives Serum im IgG getestet. Für HSV2 wurde ein negatives Serum, ein negativ-grenzwertiges Serum und ein positives Serum im IgG getestet:

	HSV1
negativ	10 neg.
schwach positiv	10 pos.
Positiv	10 pos.

	HSV2
negativ	10 neg.
Negativ-grenzwertig	5 neg. / 5 gw.
Positiv	10 pos.

12. 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. *Viol 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. Eing, BR Lippelt L, Lorentzen EU, Hafezi W, Schlumberger W, Steinhagen K, Kühn JE. 2002. Evaluation of confirmatory strategies for detection of type-specific antibodies against herpes simplex virus type 2. *J Clin Microbiol.* 40, 407-413.
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

13. Testablaufschemata

Testdurchführung in Kurzform:

Probeninkubation	30 Minuten	15 µl Patientenserum/-plasma/100 µl Kontrolle in je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Waschen	3 x 5 Minuten	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Konjugatinkubation	30 Minuten	Mit 1,5 ml Gebrauchsverdünnung (1 + 100)
Waschen	3 x 5 Minuten 1 x 1 Minute	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer Mit Aqua dest./deionisiert
Substratinkubation	10 ± 3 Minuten	Mit je 1,5 ml Substratlösung
Stoppen	3 x ohne Zwischeninkubation	Mit je 1,5 ml Aqua dest./deionisiert

Konjugatverdünnungstabelle: (gerundet)

Anzahl Streifen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Verdünnungs/ Waschpuffer	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Konjugat-Konzentrat	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Endvolumen	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Anzahl Streifen	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Verdünnungs/ Waschpuffer	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Konjugat-Konzentrat	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Endvolumen	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Anzahl Streifen	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Verdünnungs/ Waschpuffer	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Konjugat-Konzentrat	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Endvolumen	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Anzahl Streifen	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Verdünnungs/ Waschpuffer	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Konjugat-Konzentrat	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Endvolumen	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml