



SeroHSV™ IgG

Méthode immuno-enzymatique ELISA pour le dosage semi-quantitatif des anticorps anti-IgG spécifiques de L'Herpes Simplex Virus Type 1 - 2

Coffret de 96 tests

Numéro de référence : SAV 151 096

Pour usage diagnostic In Vitro

Pour usage professionnel uniquement

Conserver entre 2 et 8°C. - Ne pas congeler



Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 7761003

ISRAEL

Tel: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnostics.com

Utilisation:

SeroHSV™ IgG est destiné à effectuer le dosage semi-quantitatif des anticorps anti-IgG spécifiques des Virus 1 et 2 de L'HERPES SIMPLEX par méthode immuno-enzymatique (ELISA).

Pour Usage DIAGNOSTIC In Vitro

Intérêt diagnostique du test

L'Herpes Simplex Virus (HSV) est le virus le plus fréquemment rencontré dans les infections aiguës à récides chez les êtres humains. Une fois la maladie contractée, l'HSV infecte les cellules nerveuses sensorielles innervant les muqueuses infectées lors de l'infection aiguë, et migre dans les ganglions sensoriels localisés pour y demeurer à l'état latent. A l'état actif, le virus provoque l'apparition de vésicules et d'ulcères. La plupart des personnes infectées par l'HSV peuvent produire des particules virales périodiquement même en l'absence de signes cliniques. (1, 2, 4, 10)

Il existe deux types d' HSV : L'HSV type 1, connu sous le nom d'Herpès labial qui, le plus fréquemment, infecte la région orale provoquant des « boutons de fièvre ». L'HSV type 2, connue sous le nom d'Herpès génital qui, le plus souvent infecte la sphère génitale et la zone péri-anales. Toutefois, les deux types d'Herpès sont susceptibles de provoquer des infections à des localisations diverses et peuvent également provoquer des infections de la peau, des yeux, et du cerveau. La fréquence de récides de l'HSV-2 est supérieure à celle de l'HSV-1. (1, 5)

Les HSV de type 1 et 2 se transmettent en présence, ou en absence, de vésicules ou de tout autre symptôme clinique. La contamination se fait par la salive, les sécrétions respiratoires et par contact direct (contact sexuel, par la peau, etc.). (5, 10)

Les infections par HSV présentent des conséquences pathologiques graves particulièrement dans le cas de patients immuno-déprimés et chez les femmes enceintes. (1, 4) La transmission du virus au nouveau-né durant l'accouchement peut provoquer chez celui-ci une maladie néo-natale mettant sa vie en danger. (1) Les infections génitales par l'HSV-2 sont associées à un risque accru de cancer du col de l'utérus. (9)

Initialement, les infections par l'HSV se caractérisent par la présence transitoire d'IgM suivie par une apparition plus tardive

MA151-01F 08-06/15

d'IgG et d'IgA, qui ont tendance à persister dans le temps. Il est possible de retrouver des IgM en cas de récides graves.

Un diagnostic exact et précoce est déterminant pour initier une thérapeutique appropriée et pour maîtriser la fréquence des risques de récide.

Durant ces dernières années, on a pu constater un accroissement considérable des cas rapportés d'Herpès génital. Aux Etats Unis, lorsque l'on a atteint l'âge de 40 ans, le risque d'infection par l'HSV-2 est compris entre 20 et 25%. (1, 2) La prévalence est plus élevée parmi les femmes que parmi les hommes. L'Herpès peut représenter jusqu'à 50% des Maladies Sexuellement Transmissibles (MST). (1, 9)

L'isolement du virus, la détection de l'antigène par immunofluorescence directe (IFD) et les tests de sérologie, sont les plus couramment utilisés pour le diagnostic in vitro des infections par l'HSV. (6, 10)

La culture positive et l'IFD permettent de déterminer le type du virus. (10), donnent des résultats considérés, comme étant catégoriques. Toutefois, les difficultés de prélèvement et de transport, la longueur et la complexité de ces méthodes de détection directe font que ces méthodes ne peuvent être utilisées comme test de dépistage.

La plupart des tests sérologiques disponibles, basés sur une technique ELISA, IFI, ou d'agglutination, bien que plus aisés à réaliser, posent le problème crucial de différenciation entre les deux types d'HSV du fait de la similitude antigénique importante entre l'HSV1 et l'HSV2. Le standard universel pour différencier les anticorps de l'HSV1 de ceux de l'HSV2 est la technique Western Blot (WB) qui est un test difficile à réaliser et à interpréter.

Si l'on tient compte du fait qu'une prise de sang est un acte facile à réaliser, le diagnostic sérologique sera la méthode de dépistage la plus aisée.

Le test SeroHSV™ IgG permet la recherche des IgG anti HSV par méthode ELISA.

Principe du test

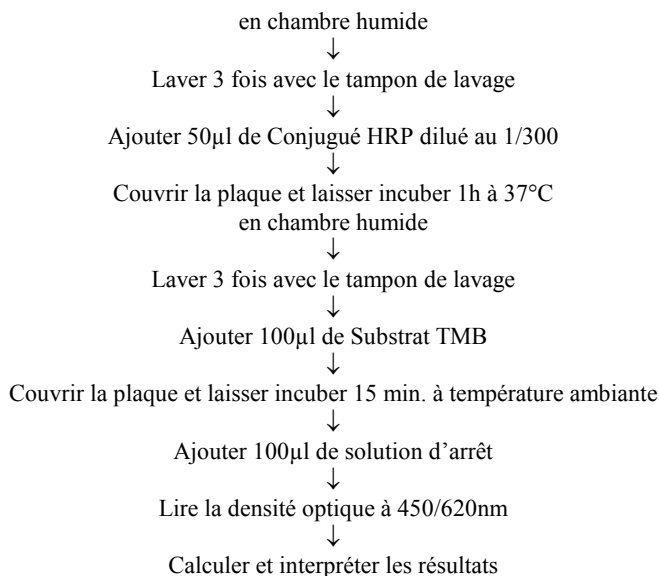
1. Un mélange de protéines de virus, partiellement purifiées, de l'HSV1 et de l'HSV2 est adsorbé sur la micro-plaque du test SeroHSV™ IgG.
2. Le sérum à tester est dilué au 1/105 et incubé dans la plaque de SeroHSV™ IgG. Durant cette étape les anticorps spécifiques se fixent à l'antigène.
3. Les anticorps non-spécifiques sont éliminés par lavages.
4. On ajoute ensuite un conjugué anti-IgG humaine couplé à la peroxydase (HRP). Durant cette étape, l'HRP se fixe au complexe antigène-anticorps formé au préalable.
5. L'excès de conjugué non fixé est éliminé par lavages. On ajoute alors un substrat TMB qui, hydrolysé par la peroxydase va développer une coloration bleue du substrat.
6. la réaction enzymatique est stoppée par l'addition d'une solution d'acide sulfurique. La couleur bleue devient alors jaune.
7. La densité optique de la solution ainsi obtenue est lue sur un lecteur de plaques ELISA à une longueur d'onde de 450/620 nm.
8. La densité optique est proportionnelle à la concentration d'anticorps spécifiques fixés sur l'antigène de la plaque.

Mode opératoire

Dans les puits de la microplaque, sensibilisés avec les antigènes de l'Herpès simplex 1 et 2

↓
Introduire 50µl de calibrateur (P10, P50, P100), de contrôle Négatif, de contrôle Positif, ainsi qu'une dilution au 1/105 de chacun des échantillons

↓
Couvrir la plaque et laisser incuber 1h à 37°C



Composition du coffret

Coffret de 96 tests

1. **Micro-Plaque sensibilisée à l'HSV:** 96 puits (8X12) sécables puits par puits, sensibilisés avec les antigènes HSV type 1 et 2, présentés dans une pochette d'aluminium scellée contenant une plaquette de produit déshydratant.
1 Plaque
2. **Tampon de lavage concentré (20 X):** Tampon PBS – Tween. Contient moins de 0.05% de Procline comme conservateur.
1 Flacon de 100ml
3. **Tampon de dilution des échantillons et des contrôles (bleu):** Tampon prêt à l'emploi. Contient moins de 0.05% de Procline comme conservateur.
1 Flacon de 30 ml
4. **Tampon de dilution du conjugué (vert):** Tampon prêt à l'emploi. Contient moins de 0.05% de Procline comme conservateur.
1 Flacon de 40 ml
5. **Calibrateur P-10:** Sérum humain *Positif* en IgG de l'HSV, prêt à l'emploi, à une concentration de 10BU/ml (Unités Arbitraires de Fixation). Contient moins de 0.1% d'azide de Sodium et de 0.05% de Procline comme conservateurs.
1 Flacon de 2 ml
6. **Calibrateur P-50:** Sérum humain *Positif* en IgG de l'HSV, prêt à l'emploi, à une concentration de 50 BU/ml (Unités Arbitraires de Fixation). Contient moins de 0.1% d'azide de Sodium et de 0.05% de Procline comme conservateurs.
1 Flacon de 2 ml
7. **Calibrateur P-100:** Sérum humain *Positif* en IgG de l'HSV, prêt à l'emploi, à une concentration de 100 BU/ml (Unités Arbitraires de Fixation). Contient moins de 0.1% d'azide de Sodium et de 0.05% de Procline comme conservateurs.
1 Flacon de 2 ml
8. **Contrôle Négatif:** Sérum humain Négatif en IgG de l'HSV, prêt à l'emploi. Contient moins de 0.05% de Procline et de 0.1% d'azide de sodium, comme conservateurs.
1 Flacon de 2 ml
9. **Contrôle Positif:** Sérum humain Positif en IgG de l'HSV, prêt à l'emploi. Contient moins de 0.05% de Procline et de 0.1% d'azide de sodium, comme conservateur.
1 Flacon de 2 ml
10. **Conjugué à la Peroxydase (concentré 300X):** Conjugué anti-IgG humaine (spécifique chaîne γ) couplé à la peroxydase. Contient moins de 0.05% de Procline comme conservateur.
1 Flacon de 0,2 ml

11. **Substrat TMB:** Solution prête à l'emploi contenant du 3', 5', 5'-Tetramethylbenzidine en tant que chromogène et du peroxyde comme substrat.
1 Flacon de 14 ml
12. **Solution d'arrêt de la réaction:** Solution prête à l'emploi de H₂SO₄ 1M.
1 Flacon de 15 ml
13. **Couvercle pour la micro-Plaque:**
1 Unité
14. **Manuel d'instructions:**
1

Matériel additionnel nécessaire non fourni

1. Tubes à essais propres pour procéder à la dilution des sérums de patients à tester.
2. Flacon de dilution à usage unique, en matière plastique, pour diluer le conjugué à la peroxydase concentré.
3. Micro-pipettes à volume ajustable et pipettes multi-canaux (gamme de :5-50, 50-200 et 200-1000µl) avec embouts jetables.
4. Une fiole jaugée de 1000 ml.
5. Un cylindre gradué de 50 ml.
6. Une bouteille de lavage.
7. Papier absorbant.
8. Vortex.
9. Un bain-marie à 37°C équipé d'un couvercle, ou une chambre humide au sein d'un incubateur à 37°C.
10. Un lecteur de micro-plaques ELISA avec filtres de 450 et 620nm.
11. Eau distillée ou déminéralisée 2 fois.

Précautions d'emploi

Pour usage DIAGNOSTIC In Vitro

1. Ce coffret contient du sérum humain testé, par des méthodes approuvées par la FDA, et révélé Négatif pour l'AgHBs et pour les anticorps de l'HCV et de l'HIV. Toutefois, compte tenu du fait qu'aucune méthode reconnue ne permet de garantir que les produits dérivés de sang humain ne transmettent pas d'infection, tous les composants de ce coffret, issus de sang humain, doivent être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.
2. La solution de substrat TMB est un produit irritant pour la peau et pour les muqueuses. Tout contact direct est à éviter.
3. Tous les composants de ce coffret ont été calibrés et testés par lot. Par conséquent, il est recommandé de ne pas mélanger les composants provenant de lots différents car cela peut fausser les résultats.
4. L'acide sulfurique dilué (H₂SO₄ 1M) est un produit irritant pour les yeux et pour la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer abondamment à l'eau courante et consulter un médecin spécialisé..

Conservation des réactifs

1. Tous les réactifs fournis doivent être conservés entre 2 et 8°C. Avant que les flacons ne soient ouverts, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret. Les réactifs encore bouchés ou scellés peuvent être conservés durant quelques heures à température ambiante sans provoquer de détériorations de ces derniers.
NE PAS CONGELER !
2. Après ouverture du coffret, la péremption est de **90 jours**.
3. Les barrettes de micro-puits non utilisées doivent être replacées dans la pochette en papier d'aluminium en présence de la plaquette de produit déshydratant. Rouler l'extrémité et obturer à l'aide de papier adhésif tout le long de l'ouverture afin d'en assurer l'étanchéité.
4. Il est possible que des cristaux se forment dans le tampon de lavage concentré 20X. Ce phénomène est parfaitement normal, il suffit de réchauffer le tampon à 37°C. avant de le diluer.

Après dilution, la solution est stable durant 21 jours, conservée entre 2 et 8°C.

Prélèvements

Préparer les sérums à partir d'échantillons sanguins prélevés aseptiquement selon les méthodes classiques. Ne pas utiliser d'échantillons de sérum ayant été inactivé par la chaleur. Il est recommandé d'éviter d'utiliser des échantillons lipémiques, troubles ou contaminés. Toute présence de matières en suspension ou de précipité peut fausser les résultats. De tels échantillons peuvent être clarifiés par centrifugation ou par filtration avant d'effectuer le test.

Conservation des prélèvements:

Les échantillons doivent être conservés entre 2 et 8°C et testés dans les 7 jours suivant leur prélèvement. Si le délai de stockage prévu est plus long, aliquoter les échantillons et congeler à -20°C. Eviter les étapes répétées de décongélation et recongélation.

Mode opératoire - Manuelle

Procédure sur automate disponible sur demande

A. Préparation des réactifs

1. Ramener tous les composants du coffret ainsi que les échantillons cliniques à température ambiante. Bien homogénéiser les calibrateurs (P-10, P-50, P-100), les contrôles négatif et positif et les échantillons cliniques avant d'effectuer le test.
2. Déterminer le nombre total d'échantillons à tester. Pour chaque série de tests, inclure 3 puits calibrateurs (P-10, P-50, P-100), 1 puits contrôle négatif et 1 puits contrôle positif.
3. Retirer la micro-plaque de sa pochette d'aluminium en coupant une extrémité proche de la partie scellée. Laisser le nombre requis de barrettes, (selon le calcul effectué précédemment), sur le support.
Les barrettes de micro-puits non-utilisées doivent être replacées dans la pochette aluminium, en présence de la plaquette de produit déshydratant. Rouler l'extrémité et obturer à l'aide de ruban adhésif tout le long de l'ouverture afin d'en assurer l'étanchéité.
4. Diluer le tampon de lavage au 1/20 avec de l'eau déminéralisée 2 fois ou de l'eau distillée. Par exemple, pour préparer 1 litre de tampon de lavage, ajoutez 50ml de tampon de lavage concentré à 950ml d'eau déminéralisée 2 fois ou d'eau distillée.

B. Incubation des échantillons sériques et des contrôles:

5. Diluer chaque sérum de patient à tester au 1/105 avec le diluant pour sérum fourni, comme suit : - Ajouter 10 µl de sérum à 200µl de diluant pour sérum (1/21), et rediluer en reprenant 25µl de la dilution au 1/21, que l'on ajoute à 100µl de diluant pour sérum.
6. Déposer 50µl de chacun des 3 calibrateurs (P-10, P-50, P-100), le contrôle négatif, le contrôle positif et 50µl de chaque dilution au 1/105 des échantillons de sérum à tester dans les puits respectifs des barrettes de la micro-plaque.
7. Couvrir avec le couvercle et laisser incubé durant 1h. à 37°C en chambre humide.
8. Jeter le liquide contenu dans les puits.
9. **Étapes de Lavages:**

Lavage Manuel : Remplir chaque puits à ras-bord avec le tampon de lavage, vider le liquide et répéter l'opération 3 fois au total.

Lavage automatique: Remplir chaque puits avec 350µl de tampon de lavage, vider le liquide et répéter l'opération 3 fois au total.

10. Sècher les barrettes et le support en les retournant et en les tapotant doucement sur un papier absorbant propre.

C. Incubation avec le conjugué HRP :

11. Le conjugué anti-IgG humaine HRP concentré doit être dilué à sa concentration d'usage juste avant son utilisation. Diluer le conjugué anti-IgG humaine HRP au 1/300 avec le diluant pour conjugué.
Par exemple pour 2 barrettes préparer un minimum de 3ml de conjugué dilué en procédant comme suit: Mélanger 10µl de conjugué concentré avec 3ml de diluant pour conjugué.
12. Déposer 50µl de conjugué HRP dilué dans chaque puits.
13. Couvrir les barrettes avec le couvercle et laisser incubé durant 1h à 37°C en chambre humide.
14. Jeter le liquide contenu dans les puits procéder à l'étape de lavage telle qu'elle est décrite ci-dessus.

D. Incubation avec le Substrat TMB :

15. Déposer 100µl de Substrat TMB dans chaque puits, couvrir les barrettes avec le couvercle et laisser incubé **15 minutes** à température ambiante.
16. La réaction est arrêtée par addition de 100µl de solution d'arrêt (H₂SO₄ 1M) dans chaque puits.

E. Détermination des résultats :

17. Lire la densité optique à 450/620nm et enregistrez les résultats obtenus. Cette lecture doit être effectuée moins de 30 minutes après l'addition de solution d'arrêt qui interrompt la réaction chromogénique.
Note: Avant la lecture, éliminer toute bulle d'air pouvant se trouver dans le liquide contenu dans les puits et essuyer soigneusement le dessous de la plaque ELISA.

Critères de validation du test

Le test est valide si les critères suivant sont atteints :

1. P100: D.O. $\geq 1,1$
 2. Contrôle Négatif : $< 10\text{BU/ml}$ (Voir le paragraphe – Calcul des résultats du test)
 3. Contrôle Positif : $\geq 30\text{BU/ml}$ (Voir le paragraphe – Calcul des résultats du test)
- Si ces critères ne sont pas atteints, le test est considéré comme n'étant pas valide et doit être recommencé.

Calcul des résultats des tests

Méthode de calcul manuel sur papier millimétré :

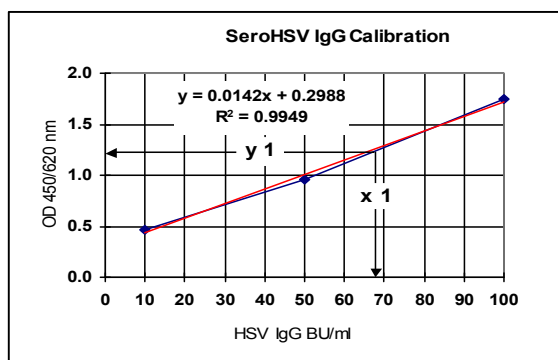
1. Reporter en ordonnées (axe des Y) les densités optiques obtenues pour les 3 calibrateurs (P10, P50 et P100) et en abscisses (axe des X) les concentrations correspondantes (BU/ml.)
2. Tracer la courbe d'étalonnage reliant ces points.
3. Sur la courbe d'étalonnage, lire la concentration des contrôles positif et négatif en BU/ml.
Le contrôle négatif doit-être : $< 10\text{BU/ml}$
Le contrôle positif doit-être : $\geq 30\text{BU/ml}$
Si le contrôle négatif et/ou positif ne se trouve pas compris dans ces limites, le test doit être répété.
4. Lire les concentrations des échantillons en BU/ml. sur la courbe d'étalonnage à partir des densités optiques obtenues. (voir exemple 1)

Exemple 1: Interpolation des résultats :

Lire en ordonnées (Y1) la densité optique de l'échantillon, et tracer une ligne horizontale jusqu'à la courbe d'étalonnage ; A partir de ce point d'interception, tracer une ligne verticale jusqu'en abscisses (X1). Lire la concentration de l'échantillon en BU/ml.

Calibrateurs	IgG BU/ml	D.O. 450/620nm
P-10	10	0.470
P-50	50	0.956
P-100	100	1.742
Echantillon	X=67	Y=1.256

Système de calibration SeroHSV™ IgG : Signal en %



Interprétation des résultats

IgG BU/ml	RESULTAT	DIAGNOSTIC
<10 BU/ml	Négatif Absence d'anti-IgG décelables	Absence d'infection HSV
≥10 BU/ml à < 50 BU/m	Positif Présence d'anti-IgG	Présence d'une infection HSV en cours, ou antérieure¹
≥50 BU/ml	Fortement positif Concentration élevée d'anti-IgG	Présence d'une infection HSV chronique, en cours ou antérieure¹

¹ La différenciation entre infection en cours et antérieure se fait en testant un deuxième échantillon prélevé 2 à 4 semaines après le premier. Si la concentration en BU/ml est augmentée de manière significative, il s'agit d'une infection en cours.

Pour évaluer si la différence entre les 2 mesures est réellement significative, le rapport des valeurs obtenues entre les 2 échantillons doit être le suivant :

$$R = \frac{BU2 + 15}{BU1 + 15}$$

BU1 = Concentration en BU/ml du 1er échantillon

BU2 = Concentration en BU/ml du 2ème échantillon

Si **R ≥ 1.7**, la différence est statistiquement significative (p=0.005). Cette équation n'est pas validée si les 2 échantillons ont une valeur inférieure à 10 BU/ml.

Limites du test

1. En aucun cas un test sérologique unique ne peut être déterminant pour établir un diagnostic définitif. Toutes les données cliniques doivent être prises en considération.
2. Un échantillon prélevé trop tôt durant la période d'infection primaire est susceptible de ne pas contenir d'anticorps à un taux décelable.
Si une infection par l'HSV est soupçonnée, prélevez un échantillon 2 à 4 semaines après le premier et testez les 2 en parallèle.

Performances du test

Précision

1- Intra essai :

ECHANTILLONS	n	Valeur Moyenne	C.V.%
Positif	10	0.998	2.2
Négatif	10	0.292	2.4

2- Inter essai :

ECHANTILLONS	n	Valeur moyenne	C.V. %
Positif	10	1.003	5.2
Négatif	10	0.285	5.8

Bibliographie

1. Ashley R.L., Wold P., clinical Microbiology reviews; Jan 1999, 12(1): 1-8.
2. Di Carlo R.P. Medscape, 1999. Preventing genital HSV infections on a large scale. 13th meeting of the international society for STD research. July 11-14th 1999.
3. Diaz-Mitoma F., Sibbald R., et al; JAMA 1998; 280: 887-92. Oral Famciclovir for the suppression of recurrent genital Herpes: A randomized controlled trial.
4. The International Herpes Management Forum (IHMF) The 12 management strategies in Herpes, 1997; 1-70.
5. Steben M., Sacks S.L., The Canadian Journal of Human Sexuality. November 1997; 1-14. <http://hwcweb.hwc.ca>
6. Genital Herpes: The epidemiology and control of a common sexually transmitted disease.
7. Screening for genital Herpes Simplex. Guide to clinical preventive services, 2nd ed. Infectious diseases. Columbia-Presbyterian Medical Center. <http://cpmcnet.columbia.edu>
8. Atlanta Maternal-Fetal Medicine, P.G. Clinical Discussions, 1996: 4(4) <http://www.atlanta-mfm.com>
9. Riott, I., Riott's Essential Immunology, 9th edition. Pp. 112-129
10. Tortora, G.S., Grabowski S.R.; Principles of anatomy and physiology, 8th edition. Pp. 88; 950.
11. Erlich Kims. Safrim Sharon. June 1998: Herpes Simplex Virus. The Aids Knowledge Base. <http://www.hivsite.ucsf.edu>
12. Brown Z, Selke S, Zeh S, N. Engl. J. Med. 1997; 337:509-15. The acquisition of Herpes Simplex Virus during pregnancy.



European Authorized Representative: Obelis s.a.
Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels, Belgium
Tel: +32.2.732.59.54 Fax: +32.2.732.60.03
E-mail: mail@obelis.net

	Limitation de température
	Consulter la notice
	Dispositif médical pour le diagnostic <i>in vitro</i>
	Fabricant
	Représentant autorisé en Europe

Fabriqué par :
Savyon Diagnostics Ltd.
3 Habosem St., Ashdod,
7761003, Israel
Tel: +972.8.856.2920
Fax: +972.8.852.3176

Distribué par :



Theradiag

14 Rue Ambroise Croizat
77183 Crossy Beaubourg
Tel : +33 1 64 62 10 12
Fax : +33 1 64 62 09 66

info@theradiag.com
