



INDIRECT FLUORESCENCE ASSAY FOR HUMAN HERPESVIRUS 6 (HHV6) IgM ANTIBODY

EXPORT ONLY

I-HV601M	120 Tests
I-HV602M	40 Tests
I-HV603M	40 Tests

Intended Use

The SCIMEDX Indirect Fluorescence Assay (IFA) for Human Herpesvirus 6 (HHV6) IgM Antibody is intended for the qualitative and semi-quantitative detection of IgM (Immunoglobulin M) antibody to HHV6 in human serum or plasma. Detection of HHV6 IgM antibody in humans can be used as an aid in the diagnosis of primary infection with this virus.

Introduction and Summary of Test Procedures

Human herpesvirus 6 (HHV6) is a human lymphotropic virus, first isolated from immunosuppressed individuals and patients with lymphoproliferative disorders. It is a DNA virus, originally named human B-lymphotropic virus (HBLV), now classified as a member of the family of human herpesviruses (1-2). HHV6 is genetically and serologically distinct from the other known human herpesviruses (2-4). Serological studies, using the indirect fluorescence assay (IFA), have shown that antibody to the virus is common in the general population. Primary infection with HHV6 usually occurs before the age of two. A high percentage of humans above the age of one are seropositive for anti-HHV6 antibody (4-6). Primary infection in adults is rare because of the high rate of infection in childhood. While primary infection in healthy adults usually results in mild illness, more serious complications can arise in immunocompromised patients or patients undergoing organ or bone marrow transplantation (4). HHV6 has been identified as the causative agent of roseola infantum, also known as exanthem subitum. The virus has been isolated from children with exanthem subitum and the association was further supported by serologic studies (7-9). Roseola infantum is considered a benign non-seasonal disease of childhood with clinical indications of rash and fever. Infants are protected by maternal antibodies so that infection is most frequent between 6 and 18 months of age. Serological information is valuable in diagnosis since detection of antibody by the IFA technique is both sensitive and specific, without cross-reaction to other human herpesviruses (3, 5, 10, 11-13).

Principle of the Test

SCIMEDX fluorescent antibody assays use the indirect method of antibody detection and titer determination. Patient serum or plasma samples are applied to cultured cells containing inactivated viral antigens provided on paint delineated wells on glass microscope slides. During a 60 minute incubation, antibody specific for HHV6 antigens forms an antigen/antibody complex with the HHV6 antigens in the infected cells. In a brief washing step, nonspecific antibodies and other unreacted serum proteins are eliminated. Fluorescein-conjugated goat anti human IgM is then applied to the wells of the glass slide. The anti-IgM conjugate combines with human IgM, if present, during a 30 minute incubation. After a brief wash to remove unreacted conjugate, the slides are viewed by fluorescence microscopy. A positive antibody reaction is denoted by bright green fluorescence at the antigen sites.

Materials Furnished and Storage Conditions

HHV6 Antigen Slides: Slides of human lymphocytes infected with HHV6 on each glass well. The slides are ready for use after removal from protective pouch. Store at 2-8°C. Slides are stable at this storage condition until the expiration date stated on the pouch label.

HHV6 IgM Positive Control: Each vial contains 0.5 ml HHV6 IgM antibody positive human control. This component is a ready for use liquid. Store at 2-8°C. Liquid positive control is stable at this storage condition until the expiration date stated on the vial label.

HHV6 IgM Negative Control: Each vial contains 0.5 ml HHV6 IgM antibody negative human control. This component is a ready for use liquid. Store at 2-8°C. Liquid negative control is stable at this storage condition until the expiration date stated on the vial label.

Fluorescein Conjugate: Each vial contains 1.5 ml fluorescein conjugated goat (inactivated) antihuman IgM (μ chain specific) with Evans Blue and Rhodamine counterstains. The fluorescein conjugate is a conjugation of affinity chromatography purified anti-human IgM with fluorescein isothiocyanate (FITC). Adding Evans Blue and Rhodamine counterstains to the conjugate masks nonspecific fluorescence of the tissue culture cells. This component is a ready for use liquid. Store at 2-8°C. Liquid conjugate is stable at this storage condition until the expiration date stated on the vial label.

Coverslip Mounting Media: Each vial contains 2.0 ml phosphate buffered glycerol with fade retardant. This component is a ready for use liquid. Storage temperature may range from refrigerated to room temperatures (2-30°C). Mounting media is stable at either storage condition until the expiration date stated on the vial label.

Phosphate Buffered Saline (PBS): Each aluminized sealed packet of powdered buffer makes one liter of 1X PBS. Storage temperatures may range from refrigerated to room temperature (2-30°C). Add the entire contents of a PBS packet to one liter of freshly prepared distilled or deionized water. Note: Addition of the salts while rapidly stirring the water will facilitate solubilization. Store PBS as a solution at 2-8°C.

Special Blotters: Absorbent blotters have pre-cut holes for use in drying the slide mask. Storage temperatures may range from refrigerated to room temperature (2-30°C).

General Precautions

IFA Test Kit: No US Standard of Potency.

- Store all kit components at their recommended or suggested temperatures. **Do not freeze.**
- Do not use the components beyond the stated expiration date of each component.
- SCIMEDX optimizes all of the active components in each lot of its IFA kits as a unit. Do not mix components from different lots or from different sources.
- The controls and conjugate contain 0.095% sodium azide that, if allowed to accumulate, can form explosive compounds in lead and/or copper plumbing. Flush drains thoroughly if used to dispose of these materials.
- Use separate pipette tips for each sample and reagent to avoid cross contamination.
- Reagents should be inspected for evidence of bacterial or fungal contamination.

Antigen slides: All IFA antigen slides have fixed cells that do not contain any viable infectious agents. However, good laboratory practices (GLP) require careful slide handling and disposal as with any other potentially biohazardous laboratory material.

- Do not remove the slides from their protective pouch until ready for use.
- Do not reuse substrate slide.

Human Controls: The human controls in these kits have all been tested for hepatitis B surface antigen (HBsAg) and human immunodeficiency virus (HIV) antibody by FDA licensed methods and found to be non-reactive. However, no test system can ensure the absence of these agents. Handle all human serum components, including those received in your laboratory for testing, as potentially biohazardous.



Xn-Harmful Substance

Control and Conjugate Safety Precaution:

Concentration of sodium azide in these components is classified as Harmful and subject to the following risk phrase: "Harmful if swallowed and contact with acids liberates very toxic gas."

US

Component	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Precautionary Statement Prevention: • Wash thoroughly after handling. • Wear eye/face protection Response: • IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. • If eye irritation persists: Get medical advice/attention. Storage/Disposal: • Dispose of content and/or container in accordance with local, regional, national, and/or international regulations.
Pictogram		
Signal Word	WARNING	
Hazard Statement	Causes serious eye irritation.	

EU

Component	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Precautionary Statement Prevention: • P264 Wash thoroughly after handling. • P280 Wear protective gloves and clothing. Response: • P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses if easy to do. Continue rinsing. • P337+P313 If irritation persists, get medical advice/attention.
Pictogram		
Signal Word	WARNING	
Hazard Statement	H319 Causes serious eye irritation	

Specimen Collection, Storage and Limitations of Test Samples

- Separate aseptically collected serum or plasma from the red blood cells and store frozen (-10°C or lower) until ready for testing. Avoid repeated freezing and thawing.
- If desired, store fresh liquid serum or plasma samples at 2° to 8°C for up to one week without loss of antibody activity.
- Do not use excessively lipemic samples without delipidization.
- Do not use contaminated samples.
- SCIMEDX recommends screening dilutions of 1:10 and 1:40 for testing purposes unless a pretreatment step removes interfering IgG. If serum is pretreated, testing at the 1:10 dilution is sufficient. We have available a pretreatment reagent. Please call customer service for additional information.

Additional Materials Required

- Test tubes, racks, pipettes, microtiter plates and safety pipetting devices for making sample dilutions
- 37°C incubator
- Moist chamber for incubating slides
- Slide holder rack and staining dish for washing slides
- Coverslips: 22 X 50 mm No. 1 thickness glass

Fluorescence microscope: A fluorescence microscope equipped with the following was used to calibrate the controls and conjugate:

- 10X eyepiece
- 16X or 40X objectives
- Epi-illuminator with 50W halogen lamp
- FITC-excitation filter KP490
- Yellow absorbing filter K530
- Red suppression filter BG38

The fluorescein label has an excitation peak of 490 nm and an emission peak of 520 nm. Differences in endpoint reactivities and fluorescence intensities may be due to the type and condition of the fluorescence equipment used in your laboratory.

IFA Procedure

1. For IgM antibody determination, prepare a 1:10 and 1:40 screening dilution of each test sample in PBS. Prepare all dilutions in a minimum volume of 0.10 ml with PBS as the diluent. For samples pretreated to remove IgG a 1:10 dilution is sufficient. SCIMEDX can provide a pretreatment reagent to remove IgG by the following procedure: Add 45 μ l of the reagent to 5 μ l of test sample and mix well. The resulting 1:10 dilution can be used immediately. Precipitation may occur but will not interfere with the IFA test results.
 2. Remove slides from protective pouch and apply 1 drop (approximately 20 μ l) of the diluted test sample(s) to each well. Add sufficient volume to completely cover each well, but cross-mixing of contents between wells should not occur.
- Note: Each day's test run requires one well each for positive control, negative control, and PBS (conjugate control).
3. Incubate the slides in a moist chamber for 60 minutes at 37°C.
 4. Rinse the slides in a light stream of buffer. Avoid directing the stream at the wells.
 5. Wash the slides for 10 minutes in PBS, changing the PBS solution after 5 minutes. Agitate the slides by moving the rack up and down in the buffer.
 6. Blot the paint mask surrounding the test wells with the special blotters provided in the kit.
 7. Apply one drop of the ready to use conjugate to each test well.
 8. Incubate the slides in a moist chamber for 30 minutes at 37°C.
 9. Repeat steps 4 (PBS rinse), 5 (10 minute PBS wash), and 6 (blot).
 10. Apply the glycerol mounting media and 22 X 50 mm glass coverslip to cover the wells of the slide.
 11. Observe the reactivity under fluorescence microscopy using 20-40X magnification. For best results, examine slides immediately after completion of the test. To obtain equivalent results, seal slides or keep humidified to minimize dehydration of mounting medium, store in dark at 2-8°C, and read within three days. Positive reactivity may range in fluorescence intensity from brilliant to weak. Grade the fluorescence reaction according to the following intensity scale: 4⁺ (brilliant), 3⁺ (bright), 2⁺ (moderate) and 1⁺ (weak).

Interpretation of Results

- Bright green fluorescent staining of the infected cells denotes an HHV6 IgM antibody positive reaction. The fluorescent staining pattern of HHV6 infected cells is variable. Depending on the cell's stage of infection, the fluorescent pattern can vary from a small portion of the infected cell fluorescing to the whole cell fluorescing. Fluorescence can also range from granular to homogeneous. To provide an internal control, each well on the microscope slide contains both HHV6 infected and uninfected cells. Preparation of the slide in this manner is intentional. Uninfected cells, stained red by the counterstain, provide a contrasting background. Infectivity of the cells ranges from 20% - 60%. Titration of positive HHV6 IgM sera is not necessary except to minimize interfering antibodies or to provide quantitative information. In a titration series, the highest serum dilution demonstrating a 1+ reaction is interpreted as the endpoint.
- Absence of specific fluorescent staining of the infected cells denotes an HHV6 IgM antibody negative reaction.

Significance of Interpretation

1. No discernible fluorescence of the infected cells found at the screening dilutions.	1. Test sample is HHV6 IgM antibody negative.
2. Specific positive fluorescence of the infected cells found at any of the screening dilutions.	2. Test sample is HHV6 IgM antibody positive, indicating current infection.
3. Fluorescence found in both infected and uninfected cells.	3. Test sample is exhibiting a non-specific reaction.

Quality Control

- To ensure the test is working properly, use the positive and negative controls at least once for each day's testing.
- The type and age of the fluorescence microscope and hours of UV bulb usage can affect fluorescence intensity and titration endpoints to some degree. The HHV6 antibody positive control furnished with this kit demonstrates a 2⁺ to 4⁺ intensity reaction. The vial has a listed titer to use as an additional check for the test system (see 1⁺ Dilution Notice). Use this as the calibrator for a 2⁺ to 4⁺ intensity reaction on your microscope.
- Use the HHV6 antibody negative control furnished with this kit as the calibrator for a negative reaction on your equipment.
- Each day's test should include one PBS well in place of a test sample. This is a conjugate control to ensure the conjugate is not reacting with the cell substrate.

1⁺ Dilution Notice

The positive control in this kit is ready to use and provides a 2⁺ to 4⁺ fluorescent intensity when tested. To obtain a 1⁺ fluorescent intensity make two-fold dilutions to the titer indicated on the vial included in this kit. Titer the positive control with the initial use of the kit. The titer you obtain in testing may differ from the listed endpoint titer due to a number of technical reasons. It is best to test the titer indicated on the vial, as well as the two-fold dilution immediately preceding and following the listed titer. It is normal for results obtained for an endpoint (1⁺) titer to differ between laboratories due to factors affecting the intensity of fluorescence. These factors include:

- the power rating of the UV light source in the microscope
- the kind of light source
- the age of the lamp
- the length of the optical path of the microscope and the types of optical filters used
- the accuracy of dilution techniques and the dilution equipment

Limitations of the Procedure

- A serological test such as the IFA serves as an aid to detect viral infection, but its use should not be the sole criteria. The test results should be used in conjunction with information available from the patient, clinical evaluation and other available diagnostic procedures.
- Nonspecific positive reactions such as antinuclear antibody and/or anticytoplasmic antibody reactions can occur in samples from patients with certain autoimmune diseases. Both infected and uninfected cells will fluoresce, and this may obscure a positive HHV6 reaction. Therefore, observation of an autoimmune reaction cannot eliminate the possibility of HHV6 infection.
- SCIMEDX recommends pretreatment of test samples to remove IgG antibody. This additional step helps eliminate false negative and false positive results. When IgG antibody competes with IgM antibody for specific binding sites, IgG antibody can cause a false negative result. When IgG antibody forms immune complexes with the antigenic substrate that may then bind rheumatoid factor (IgM class), IgG antibody can cause a false positive result.
- A sample obtained too early during infection may not contain detectable levels of IgM antibody. If a viral infection is suspected, a second sample should be obtained 7-14 days later. The second sample should be tested concurrently with the first specimen to look for seroconversion or a significant rise in titer of viral-specific IgM or IgG. Either seroconversion or significant rise in titer is indicative of primary infection.
- Because of the possibility of contamination of cord blood with maternal IgM, it is prudent to confirm positive viral IgM antibody results on cord blood samples by testing a follow-up specimen from the infant, preferably within the first five days of life (14).
- Specific IgM antibodies are usually detected in patients with recent primary infection. IgM antibodies may be found in patients with reactivated or secondary infections, or in patients with no other detectable evidence of recent infection (15).

Performance Characteristics

Relative Sensitivity and Specificity: The SCIMEDX HHV6 IgM IFA kit was evaluated relative to a commercially available HHV6 IgM ELISA. The study tested nineteen frozen samples at a commercial clinical laboratory. The overall agreement was 18/19 or 94.7%. The table below summarizes the data.

SCIMEDX IFA				
Alternate ELISA	HHV6 IgM	Reactive	Non-reactive	Total
	Reactive	5	0	5
	Non-reactive	1	13	14
	Total	6	13	19

Reproducibility: Four seropositive sera with various titers (1:10 to 1:80) and six seronegative sera were serially two-fold diluted and assayed three times each on three different assays and the endpoint determined. All thirty endpoint titers were within specifications of $\pm$ one two-fold dilution.

Identical Titer 28/30
 $\pm$ one, two-fold dilution 2/30

Specificity: Thirteen sera with antibody activity to diseases that have the potential for cross-reactivity to HHV6 IgM were tested on this IFA kit. No cross-reactivity was observed for any of the samples. Refer to the table below.

Cross Reactivity Data-SCIMEDX HHV6 IgM IFA

Disease Type	Total Samples	Positive Result
Cytomegalovirus	4	0/4
Epstein-Barr virus	3	0/3
Herpes Simplex Virus 1	4	0/4
Varicella Zoster Virus	2	0/2
Total	13	0/13

Real Time Stability: Real time stability testing of kit components was carried out at 6 month intervals for a minimum of 24 months. The endpoint titer of the positive and negative controls was compared to the endpoint titers at release. Acceptance criteria are endpoint titers within one two-fold dilution of each other. These results were within specifications.

Real Time Stability

Slide Lot	Control	Endpoint Titer at Release	Endpoint Titer at 24 months
#1	Positive	1:40	1:20
	Negative	—	—
#2	Positive	1:40	1:20
	Negative	—	—
#3	Positive	1:40	1:20
	Negative	—	—

Literature Cited

- Salahuddin, A.K., D.V. Ablashi, P.D. Markham, S.F. Josephs, S. Sturzenegger, M. Kaplan, G. Halligan, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, B. Kramarsky, and R.C. Gallo. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 234:596-601.
- Josephs, S.F., S.Z. Salahuddin, D.V. Ablashi, F. Schacter, F. Wong-Staal, and R.C. Gallo. 1986. Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science*. 234:601-603.
- Ablashi, D.V., S.F. Josephs, A. Buchbinder, K. Hellman, S. Nakamura, T. Llana, P. Lusso, M. Kaplan, J. Dahlberg, S. Memon, F. Imam, K.L. Ablashi, P.D. Markham, B. Kramarsky, G.R.F. Krueger, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, S.Z. Salahuddin, and R.C. Gallo. 1988. Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus 6). *J. Virol. Methods*. 21:29-48.
- Stewart, J.A. 1990. Human herpesvirus 6: basic biology and clinical associations. In L.M. de la Maja and E. M. Peterson (ed.), *Medical virology*, Vol. 9. Plenum Press, New York.
- Linde, A., H. Dahl, B. Wahren, E. Fridell, Z. Salahuddin, and P. Biberfeld. 1988. IgG antibodies to human herpesvirus 6 in children and adults both in primary Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections. *J. Virol. Methods*. 21:117-123.
- Briggs, M., J. Fox, and R.S. Tedder. 1988. Age prevalence of antibody to human herpesvirus 6. *Lancet*. i:396.
- Yamanishi, K., T. Okuno, K. Shiraki, M. Tarahashi, T. Kando, Y. Asano, and T. Kurata. 1988. Identification of human herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. i:1065-1067.
- Takahishi, K., S. Smoda, K. Kawakami, K. Migata, T. Oki, and T. Nagata. 1988. Human herpesvirus 6 and exanthem subitum. *Lancet*. i:1463.
- Ueda, K., K. Kusuvara, M. Hirase, K. Okada, C. Migajaki, K. Tokugawa, M. Nakagawa, and K. Yamanishi. 1989. Exanthem subitum and antibody to human herpesvirus 6. *J. Infect. Dis.* 159:750-752.
- Irving, W.L., and A.L. Cunningham. 1990. Serological diagnosis of infection with human herpesvirus type 6. *Br. Med. J.* 300:158-159.
- Linnavouri, K., H. Peltola, and T. Hovi. 1992. Serology versus clinical signs or symptoms and main laboratory findings in the diagnosis of exanthem subitum (roseola infantum). *Pediatrics*. 89:103-106.
- Pruksananonda, P., C.B. Hall, R.A. Insul, K. McIntyre, P.E. Pellett, C.E. Long, K.C. Schnabel, P.H. Pincus, F.R. Stamey, T.R. Dambaugh, and J.A. Stewart. 1992. Primary human herpesvirus 6 infections in young children. *N. Engl. J. Med.* 326:1445-1450.
- Hall, C.B., C.E. Long, K.C. Schnabel, M.T. Caserta, K.M. McIntyre, M.A. Costanzo, A. Knott, S. Dewhurst, R.A. Insul, and L.G. Epstein. 1994. Human herpesvirus 6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N. Engl. J. Med.* 331:432-438.
- Schmidt, N.J. 1984. Update on class-specific viral antibody assays. *Clin. Immunol. News*. 5: 81-85.
- Krueger, G.R.F., D.V. Ablashi, S.F. Joseph, S.Z. Salahuddin, U. Lembke, A. Ramon, and G. Bertram. 1991. Clinical indications and diagnostic techniques of human herpesvirus-6 (HHV6) infection. *In Vivo*. 5:287-296.

SCIMEDX CORPORATION
513 Brighton Rd
Dover, NJ 07801 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.6796
www.scimedx.com

EC	REP	Medimark Europe 11, rue Zola – BP 2332 F-38033 Grenoble Cedex 2 - France	CE
----	-----	--	----



ESSAI BIOLOGIQUE DE FLUORESCENCE INDIRECTE SPECIFIQUE A L'ANTICORPS IgM ANTI- HUMAN HERPESVIRUS 6 (HHV6)

Destiné à l'exportation uniquement
Réservé au diagnostic *in vitro*.

I-HV601M	120 Tests
I-HV602M	40 Tests
I-HV603M	40 Tests

Utilisation prévue

L'essai par fluorescence indirecte (IFA) de SCIMEDX Corp. pour l'anticorps anti-IgM du virus de l'herpès humain 6 (HHV6) est conçu pour la détection qualitative et semi quantitative de l'anticorps anti-IgM (immunoglobuline M) du HHV6 dans le sérum ou le plasma humains. La détection de l'anticorps anti-IgM du HHV6 chez l'homme peut être utilisée pour faciliter le diagnostic de primo-infection par ce virus.

Présentation et résumé des procédures de test

Le virus de l'herpès humain 6 (HHV6) est un virus lymphotrope humain, d'abord isolé chez les individus immunodéprimés et chez les patients souffrant de troubles lymphoprolifératifs. Il s'agit d'un virus à ADN, appelé virus lymphotrope B humain (HBLV) à l'origine, désormais classé dans la famille des virus de l'herpès humain (1-2).

Le HHV6 est distinct des autres virus de l'herpès humain connus du point de vue génétique et sérologique (2-4). Des études sérologiques, utilisant des essais par fluorescence indirecte (IFA), ont montré que l'anticorps dirigé contre le virus est courant dans la population générale. La primo-infection par HHV6 survient généralement avant l'âge de deux ans. Un pourcentage élevé de sujets de plus d'un an est séropositif aux anticorps anti-HHV6 (4-6). La primo-infection chez l'adulte est rare en raison du taux élevé d'infection dans l'enfance. Alors que la primo-infection chez l'adulte sain se traduit en général par de légers troubles, des complications plus graves peuvent survenir chez des patients immunodéprimés ou chez des patients subissant une greffe d'organe ou de moelle osseuse (4).

Le HHV6 a été identifié comme étant l'agent causal de la **roséole infantile**, également appelée **exanthème subit**. Le virus a été isolé chez des enfants présentant un **exanthème subit** et cette association a été ensuite corroborée par des examens sérologiques (7-9). La **roséole infantile** est considérée comme une maladie infantile non saisonnière bénigne dont les symptômes cliniques sont des éruptions cutanées et de la fièvre. Les nourrissons sont protégés par les anticorps maternels de sorte que l'infection est plus fréquente entre 6 et 18 mois. Les données sérologiques permettent de poser le diagnostic car la détection de l'anticorps par la technique de l'IFA est à la fois sensible et spécifique, sans réaction croisée avec d'autres virus de l'herpès humain (3,5,10,11-13).

Principe du test

Les essais par fluorescence sur l'anticorps de SCIMEDX Corp. utilisent la méthode indirecte de détection de l'anticorps et de détermination du titre. Les échantillons de sérum ou de plasma des patients sont appliqués à des cultures cellulaires contenant des antigènes viraux inactivés fournis sur des puits délimités à la peinture sur des lames de microscope en verre. Au cours d'une incubation de 60 minutes, l'anticorps spécifique aux antigènes anti-HHV6 forme un complexe antigène/anticorps avec les antigènes anti-HHV6 des cellules infectées. Les anticorps non spécifiques et d'autres protéines sériques non activées sont éliminés par une brève étape de lavage. L'IgM de chèvre anti-humaine conjuguée à de la fluorescéine est alors ajoutée aux puits de la lame de verre. Le conjugué anti-IgM se lie à l'IgM humaine, le cas échéant, au cours d'une incubation de 30 minutes. Après un bref lavage visant à éliminer le conjugué non activé, les lames sont observées au microscope à fluorescence. Une réaction positive à l'anticorps est indiquée par une fluorescence vert brillant sur les sites de l'antigène.

Matériels fournis et conditions de conservation

Lames d'antigène anti-HHV6 : Lames de lymphocytes humains infectés par le HHV6 sur chaque puits. Les lames sont prêtes à l'emploi dès leur sortie de la poche de protection. Conserver entre 2 et 8 °C. Les lames sont stables dans ces conditions de stockage jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la poche.

Contrôle positif aux IgM du HHV6 : Chaque flacon contient 0,5 ml de contrôle humain positif à l'anticorps anti-IgM du HHV6. Ce composant est un liquide prêt à l'emploi. Conserver entre 2 et 8 °C. Le contrôle positif liquide est stable dans ces conditions de stockage jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon.

Contrôle négatif aux IgM du HHV6 : Chaque flacon contient 0,5 ml de contrôle humain négatif à l'anticorps anti-IgM du HHV6. Ce composant est un liquide prêt à l'emploi. Conserver entre 2 et 8 °C. Le contrôle négatif liquide est stable dans ces conditions de stockage jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon.

Conjugué fluorescéine : Chaque flacon contient 1,5 ml d'IgM anti-humaines (inactivées) (spécifiques aux chaînes μ) de chèvre conjuguées à la fluorescéine avec contre-colorants : bleu d'Evans et rhodamine. Le conjugué de fluorescéine est une association d'IgM anti-humaines purifiées par chromatographie d'affinité avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). L'ajout des contre-colorants bleu d'Evans et rhodamine au conjugué masque la fluorescence non spécifique des cultures de cellules tissulaires. Ce composant est un liquide prêt à l'emploi. Conserver entre 2 et 8 °C. Le conjugué liquide est stable dans ces conditions de stockage jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon.

Milieu de montage de protection : Chaque flacon contient 2,0 ml de glycérol tampon phosphate comportant un retardateur de perte de coloration. Ce composant est un liquide prêt à l'emploi. La température de conservation peut aller de réfrigérée à ambiante (entre 2 et 30 °C). Le milieu de montage est stable quelles que soient les conditions de conservation jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon.

Tampon phosphate salin (PBS) : Chaque paquet en aluminium hermétique contenant le tampon en poudre permet d'obtenir un litre de PBS 1X. La température de conservation peut aller de réfrigérée à ambiante (entre 2 et 30 °C). Ajouter l'intégralité du contenu d'un paquet de PBS à un litre d'eau distillée ou déionisée préparée récemment. Remarque : Tout en mélangeant rapidement, l'ajout de sels facilite la solubilisation. Conserver le PBS comme une solution entre 2 et 8 °C.

Papiers absorbants spéciaux : Les papiers absorbants comportent des trous prédécoupés pour le séchage du masque de la lame. La température de conservation peut aller de réfrigérée à ambiante (entre 2 et 30 °C).

Précautions générales

Kit de test IFA : Aucune norme américaine de puissance.

- Stocker tous les composants du kit aux températures recommandées. **Ne pas congeler.**
- Ne pas utiliser les composants après la date de péremption de chaque composant.

- SCIMEDX optimise tous les composants actifs de chaque lot de ces kits IFA pour être utilisés ensemble. Ne pas mélanger les composants de différents lots ou provenant de différentes sources.
- Les contrôles et conjugués contiennent de l'azide de sodium à 0,095 % qui, en cas de dépôt, peut former des composés explosifs dans les canalisations en plomb et/ou en cuivre. Rincer abondamment les canalisations utilisées pour éliminer ces matériaux.
- Utiliser des pointes de pipettes pour chaque échantillon et réactif pour éviter la contamination croisée.
- Les réactifs doivent être inspectés pour preuve de contamination bactérienne ou contamination fongique.

Lames d'antigène : Toutes les lames d'antigène pour l'IFA comportent des cellules fixées qui ne contiennent aucun agent infectieux viable. Cependant, les bonnes pratiques de laboratoire requièrent de manipuler et d'éliminer avec précaution les lames, comme pour tout autre matériau de laboratoire présentant un risque biologique.

- Ne pas sortir les lames de leur poche de protection avant d'être prêt à effectuer la procédure.
- Ne pas réutiliser lame.

Contrôles humains : Les contrôles humains de ces kits ont tous été testés afin de rechercher les anticorps de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) et du virus de l'immédiocence humaine (VIH) par des méthodes approuvées par la FDA et se sont révélés non réactifs. Cependant, aucun système de test ne peut garantir l'absence de ces agents. Manipuler tous les composants sériques humains, notamment ceux provenant de votre laboratoire et devant être testés, comme présentant un risque biologique.



Xn - Substance dangereuse

Consignes de sécurité pour le conjugué et le contrôle :

Le taux d'azide de sodium dans ces composants est classé « dangereux » et soumis aux phrases de risque suivantes : « Nocif en cas d'ingestion et au contact d'un acide dégage un gaz très toxique. »

Composant	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Déclaration de précaution
Pictogramme		Prévention: P264 Se laver ... soigneusement après manipulation. P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
Mot de signal	ATTENTION	Réponse: P305+P351+P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. P337+P313 Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.
Mention de danger	H319 Provoque une sévère irritation des yeux.	

Prélèvement et conservation des échantillons et limites des échantillons à tester

Les échantillons de sérum ou de plasma collectés de manière aseptique doivent être séparés des globules rouges et congelés (-10 °C minimum) jusqu'à ce que vous soyez prêt à effectuer l'analyse. Éviter de décongeler et de recongeler.

Si nécessaire, les échantillons de sérum et de plasma liquides récemment prélevés peuvent être stockés entre 2 et 8 °C pendant une semaine maximum sans perte d'activité de l'anticorps.

Ne pas utiliser d'échantillons présentant une lipémie excessive sans délipidation.

Ne pas utiliser d'échantillons contaminés.

SCIMEDX recommande d'utiliser des dilutions de dépistage à 1:10 et à 1:40 à des fins d'analyse à moins qu'une étape de prétraitement ne supprime les IgG pouvant constituer des interférences. Si le sérum est prétraité, l'analyse à une dilution de 1:10 est suffisante. SCIMEDX met à votre disposition un réactif de prétraitement. Veuillez contacter votre service client pour plus d'informations.

Matériels supplémentaires requis

Tubes à essais, portoirs, pipettes, plaques de microtitrage et dispositifs de pipetage de sécurité pour effectuer les dilutions d'échantillon

Incubateur à 37 °C

Chambre humide pour l'incubation des lames

Portoir de lames et boîte de coloration pour le lavage des lames

Lames de protection : 22 X 50 mm épaisseur de verre n°1

Microscope à fluorescence : Un microscope à fluorescence équipé des éléments suivants a été utilisé pour étalonner les contrôles et le conjugué :

- Oculaire 10X
- Objectifs 16X ou 40X
- Négatoscope avec ampoule halogène 50W
- Filtre d'excitation FITC KP490
- Filtre d'absorption des jaunes K530
- Filtre de suppression des rouges BG38

L'étiquette de la fluorescéine indique un pic d'excitation de 490 nm et un pic d'émission de 520 nm. Les différences de réactivité finale et d'intensité de fluorescence peuvent être dues au type et à l'état de l'équipement de fluorescence utilisé dans votre laboratoire.

Procédure IFA

1. Pour la détermination de l'anticorps anti-IgM, préparer une dilution de dépistage à 1:10 et 1:40 de chaque échantillon de test dans du PBS. Préparer toutes les dilutions dans un volume minimum de 0,10 ml avec du PBS comme diluant. Pour les échantillons prétraités pour supprimer les IgG, une dilution à 1:10 est suffisante. SCIMEDX peut fournir un réactif de prétraitement pour supprimer les IgG conformément à la procédure suivante : Ajouter 45 μ l de réactif à 5 μ l d'échantillon à analyser et bien mélanger. La dilution à 1:10 ainsi préparée peut être utilisée immédiatement. Une précipitation peut se produire mais n'interfère pas avec les résultats de l'analyse IFA.
2. Sortir les lames de la poche de protection et appliquer 1 goutte (environ 20 μ l) du ou des échantillon(s) à tester dilué(s) dans chaque puits. Ajouter un volume suffisant pour couvrir entièrement chaque puits mais en évitant tout mélange croisé des contenus entre les différents puits.

Remarque : Le cycle d'analyse quotidien requiert des puits distincts pour le contrôle positif, le contrôle négatif et le PBS (contrôle de conjugué).

3. Incuber les lames dans une chambre humide pendant 60 minutes à 37 °C.
4. Rincer les lames sous un léger filet de tampon. Éviter de diriger le liquide vers les puits.
5. Laver les lames pendant 10 minutes dans du PBS en changeant le tampon PBS au bout de 5 minutes. Agiter les lames en secouant de haut en bas le portoir dans le tampon.
6. Absorber le masque de peinture entourant les puits de test à l'aide des papiers absorbants spéciaux fournis dans le kit.

- Appliquer une goutte de conjugué prêt à l'emploi dans chaque puits de test.
- Incuber les lames dans une chambre humide pendant 30 minutes à 37 °C.
- Répéter les étapes 4 (rinçage au PBS), 5 (10 minutes de lavage au PBS) et 6 (papier absorbant).
- Appliquer le milieu de montage au glycérol et une lame de verre de 22 X 50 mm sur les puits de la lame.
- Observer la réactivité au microscope à fluorescence en utilisant un grossissement de 20 à 40X. Pour de meilleurs résultats, examiner les lames immédiatement après analyse. Pour obtenir des résultats équivalents, sceller les lames ou les conserver humidifiées pour minimiser la déshydratation du milieu de montage, stocker à l'abri de la lumière entre 2 et 8 °C, et lire dans les trois jours. La réactivité positive peut se manifester par une intensité de fluorescence allant de brillante à faible. Évaluer la réaction de fluorescence en fonction de l'échelle d'intensité suivante : 4* (brillante), 3* (claire), 2* (modérée), 1* (faible).

Interprétation des résultats

La coloration fluorescente vert clair des cellules infectées indique une réaction positive à l'anticorps anti-IgM du HHV6. Le schéma de fluorescence des cellules infectées par le HHV6 est variable. Selon le niveau d'infection des cellules, le schéma fluorescent peut varier d'une fluorescence touchant un faible nombre de cellules infectées à une fluorescence de toutes les cellules. La fluorescence peut également présenter divers aspects, de granulaire à homogène. Pour fournir un contrôle interne, chaque puits de la lame de microscope contient à la fois des cellules infectées par le HHV6 et non infectées. La préparation de la lame de cette manière est intentionnelle. Les cellules non infectées, colorées en rouge par le contre-colorant, fournissent une coloration de contraste. L'inféctivité des cellules est comprise entre 20 et 60 %. Le titrage des échantillons sériques d'IgM du HHV6 positifs n'est pas nécessaire sauf pour minimiser l'effet des anticorps interférents ou pour obtenir des données quantitatives. Dans une série de titrages, la dilution de sérum la plus élevée indiquant une réaction de 1* est interprétée comme le résultat final.

L'absence de coloration fluorescente spécifique des cellules infectées indique une réaction négative à l'anticorps anti-IgM du HHV6.

Importance de l'interprétation

1. Fluorescence non discernable des cellules infectées observée aux dilutions de dépistage.	1. L'échantillon analysé est négatif aux anticorps anti-IgM du HHV6.
2. Fluorescence positive spécifique des cellules infectées observée quelle que soit la dilution de dépistage.	2. L'échantillon analysé est positif aux anticorps anti-IgM du HHV6, ce qui indique une infection au HHV6 en cours.
3. Fluorescence observée à la fois dans les cellules infectées et non infectées.	3. L'échantillon analysé présente une réaction non spécifique.

Contrôle qualité

- Pour garantir le bon fonctionnement du test, utiliser les contrôles positif et négatif au moins une fois par jour de test.
- Le type et l'ancienneté du microscope à fluorescence et le nombre d'heures d'utilisation de l'ampoule UV peuvent affecter, dans une certaine mesure, l'intensité de la fluorescence et les résultats finaux de titrage. Le contrôle positif à l'anticorps anti-HHV6 fourni avec ce kit est embouteillé qui présente une réaction d'intensité 2* à 4*. Ce flacon a un titre listé qui doit être utilisé comme vérification supplémentaire du système de test (voir la Remarque sur la dilution 1*). Utiliser ce produit comme étalon pour une réaction d'intensité de 2* à 4* sur votre microscope.
- Utiliser le contrôle négatif à l'anticorps anti-HHV6 fourni avec ce kit comme étalon pour une réaction négative sur votre équipement.
- Chaque test du jour doit inclure un puits de PBS au lieu d'un échantillon à analyser. Il s'agit d'un contrôle du conjugué destiné à s'assurer que le conjugué ne réagit pas avec le substrat cellulaire.

Remarque sur la dilution 1*

Le contrôle positif de ce kit est embouteillé est prêt à utiliser et fournit une intensité de fluorescence de 2* à 4* lors de l'analyse. Pour obtenir une intensité de fluorescence de 1*, réaliser des dilutions à deux volumes du titre indiqué sur le flacon inclus dans ce kit. Titrer le contrôle positif lors de la première utilisation du kit.

Le titre obtenu lors de l'analyse peut différer du titre final listé du fait d'un certain nombre de raisons techniques. Il vaut mieux tester le titre indiqué sur le flacon, ainsi qu'une dilution à deux volumes immédiatement avant et après le titre listé. Il est normal que les résultats obtenus pour un titre final (1*) diffèrent selon les laboratoires en raison de facteurs affectant l'intensité de fluorescence. Parmi ces facteurs figurent :

- la classification de puissance de la source de lumière UV au niveau du microscope
- le type de source lumineuse
- l'ancienneté de l'ampoule
- la longueur du chemin optique du microscope et les types de filtres optiques utilisés
- la précision des techniques de dilution et de l'équipement de dilution

Limites de la procédure

- Un test sérologique comme l'IFA facilite la détection de l'infection virale mais ne doit pas constituer le seul critère. Les résultats du test doivent être utilisés en association avec les données disponibles du patient, l'examen clinique et toute autre procédure de diagnostic disponible.
- Des réactions positives non spécifiques telles les réactions des anticorps antinucléaire et/ou anti-cytoplasmique peuvent se produire dans des échantillons de patients présentant certaines maladies auto-immunes. Les cellules infectées comme les cellules non infectées sont alors fluorescentes, ce qui peut masquer une réaction positive au HHV6. Par conséquent, l'observation d'une réaction auto-immune ne peut éliminer la possibilité d'une infection par le HHV6.
- SCIMEDX recommande de prétraiter les échantillons analysés afin de supprimer les anticorps anti-IgG. Cette étape supplémentaire permet d'éliminer les faux négatifs et les faux positifs. Lorsque l'anticorps anti-IgG est en concurrence avec l'anticorps anti-IgM pour les sites de liaison spécifiques, l'anticorps anti-IgG peut entraîner un faux négatif. Lorsque l'anticorps anti-IgG forme des complexes immuns avec le substrat antigénique, susceptibles ensuite de se lier au facteur rhumatoïde (de classe IgM), l'anticorps anti-IgG peut entraîner un faux positif.
- Un échantillon obtenu trop précocement pendant l'infection peut ne pas contenir des niveaux détectables d'anticorps anti-IgM. S'il y a suspicion d'infection virale, un second échantillon doit être prélevé 7 à 14 jours plus tard. Le second échantillon doit être testé en même temps que le premier afin de rechercher une séroconversion ou une augmentation significative du titre des IgM ou IgG spécifiques au virus. Une séroconversion ou une augmentation significative du titre indique une primo-infection.
- En raison de la possibilité de contamination du sang ombilical par les IgM maternelles, il est prudent de confirmer un résultat positif à l'anticorps anti-IgM viral des échantillons de sang ombilical en testant un échantillon de suivi du nourrisson, prélevé de préférence dans les cinq premiers jours de vie (14).

- Les anticorps anti-IgM spécifiques sont généralement détectés chez les patients présentant une primo-infection récente. Les anticorps anti-IgM sont présents chez les patients souffrant d'infections réactivées ou secondaires, ou chez les patients ne présentant aucun autre symptôme détectable d'infection récente (15).

Caractéristiques de performance

Sensibilité et spécificité relatives : Le kit IgM HHV6 IFA de SCIMEDX Corp. a été évalué par rapport à un autre kit HHV6 IgM IFA disponible dans le commerce. L'étude portait sur dix-neuf échantillons congelés dans un laboratoire clinique commercial. La concordance globale était de 18/19, soit 94,7 %. Le tableau ci-dessous résume ces données.

IFA de SCIMEDX				
Autre ELISA	État des IgM du HHV6	Réactif	Non réactif	Total
	Réactif	5	0	5
	Non réactif	1	13	14
	Total	6	13	19

Reproductibilité : Quatre échantillons de sérum positifs à divers titres (de 1:10 à 1:80) et six échantillons de sérum négatifs ont été dilués à deux volumes en série et testés trois fois chacun lors de trois essais différents afin de déterminer le résultat final. Les trente titres finaux se situaient dans la plage de $\pm$ une dilution à deux volumes.

Titre identique	28/30
$\pm$ une dilution à deux volumes	2/30

Spécificité : Treize échantillons de sérum présentant une activité de l'anticorps pour des maladies susceptibles de montrer une réactivité croisée envers les IgM du HHV6 ont été analysés avec ce kit IFA. Aucune réactivité croisée n'a été observée pour aucun des échantillons. Voir le tableau ci-dessous.

Données sur la réactivité croisée – IgM HHV6 IFA de SCIMEDX

Type de maladie	Nombre total d'échantillons	Résultat positif
Cytomégalovirus	4	0/4
Virus d'Epstein-Barr	3	0/3
Virus de l'herpès simplex 1	4	0/4
Virus varicelle-zona	2	0/2
Total	13	0/13

Stabilité en temps réel : Un test de stabilité en temps réel des composants du kit a été mené à 6 mois d'intervalle pendant 24 mois minimum. Les titres finaux des contrôles positif et négatif ont été comparés aux titres finaux lors de la libération. Les critères d'acceptation sont les titres finaux dans une dilution de deux volumes l'un de l'autre. Ces résultats s'inscrivaient dans les plages prédéfinies.

Stabilité en temps réel

Lot de lames	Contrôle	Titre final lors de la libération	Titre final à 24 mois
#1	Positif	1:40	1:20
	Négatif	–	–
#2	Positif	1:40	1:20
	Négatif	–	–
#3	Positif	1:40	1:20
	Négatif	–	–

Bibliographie

- Salahuddin, A.K., D.V. Ablashi, P.D. Markham, S.F. Josephs, S. Sturzenegger, M. Kaplan, G. Halligan, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, B. Kramarsky, and R.C. Gallo. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 234:596-601.
- Josephs, S.F., S.Z. Salahuddin, D.V. Ablashi, F. Schacter, F. Wong-Staal, and R. C. Gallo. 1986. Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science*. 234:601-603.
- Ablashi, D.V., S.F. Josephs, A. Buchbinder, K. Hellman, S. Nakamura, T. Liana, P. Lusso, M. Kaplan, J. Dahlberg, S. Memon, F. Imam, K.L. Ablashi, P.D. Markham, B. Kramarsky, G.R.F. Krueger, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, S.Z. Salahuddin, and R.C. Galo. 1988. Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus 6). *J. Virol. Methods*. 21:29-48.
- Stewart, J.A. 1990. Human herpesvirus 6: basic biology and clinical associations. In L.M. de la Maja and E. M. Peterson (ed.), *Medical virology*, Vol. 9. Plenum Press, New York.
- Linde, A., H. Dahl, B. Wahren, E. Fridell, Z. Salahuddin, and P. Biberfeld. 1988. IgG antibodies to human herpesvirus 6 in children and adults both in primary Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections. *J. Virol. Methods*. 21:117-123.
- Briggs, M., J. Fox, and R.S. Tedder. 1988. Age prevalence of antibody to human herpesvirus 6. *Lancet*. i:396.
- Yamanishi, K., T. Okuno, K. Shiraki, M. Tarahashi, T. Kando, Y. Asano, and T. Kurata. 1988. Identification of human herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. i:1065-1067.
- Takahishi, K., S. Smoda, K. Kawakami, K. Migata, T. Oki, and T. Nagata. 1988. Human herpesvirus 6 and exanthem subitum. *Lancet*. i:1463.
- Ueda, K., K. Kusuhara, M. Hirase, K. Okada, C. Migajaki, K. Tokugawa, M. Nakagawa, and K. Yamanishi. 1989. Exanthem subitum and antibody to human herpesvirus 6. *J. Infect. Dis.* 159:750-752.
- Irving, W.L., and A.L. Cunningham. 1990. Sero logical diagnosis of infection with human herpesvirus 6. *Br. Med. J.* 300:158-159.
- Linnavouri, K., H. Peltola, and T. Hovi. 1992. Serology versus clinical signs or symptoms and main laboratory findings in the diagnosis of exanthem subitum (roseola infantum). *Pediatrics*. 89:103-106.
- Pruksananonda, P., C.B. Hall, R.A. Insul, K. McIntyre, P.E. Pellett, C.E. Long, K.C. Schnabel, P.H. Pincus, F.R. Stamey, T.R. Dambach, and J.A. Stewart. 1992. Primary human herpesvirus 6 infections in young children. *N. Engl. J. Med.* 326:1445-1450.
- Hall, C.B., C.E. Long, K.C. Schnabel, M.T. Caserta, K.M. McIntyre, M.A. Costanzo, A. Knott, S. Dewhurst, R.A. Insul, and L.G. Epstein. 1994. Human herpesvirus 6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N. Engl. J. Med.* 331:432-438.
- Schmidt, N.J. 1984. Update on class-specific viral antibody assays. *Clin. Immunol. Newsl.* 5: 81-85.
- Krueger, G.R.F., D.V. Ablashi, S.F. Joseph, S.Z. Salahuddin, U. Lembke, A. Ramon, and G. Bertram. 1991. Clinical indications and diagnostic techniques of human herpesvirus-6 (HHV6) infection. *In Vivo*. 5:287-296.

SCIMEDX CORPORATION
53 Hightbynton Hd
Dover, NJ 07801 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8796
www.scimedx.com

EC	REP	Medimark Europe 11, rue Zola – BP 2332 F-38033 Grenoble Cedex 2 - France	CE
----	-----	---	----



INDIREKTER FLUORESCENZ-ASSAY AUF HUMAN HERPESVIRUS 6 (HHV6) IgM-ANTIKÖRPER

Nur zum Export bestimmt

Die Tests sind für die *diagnostische Verwendung in vitro* bestimmt.

I-HV601M	120 Tests
I-HV602M	40 Tests
I-HV603M	40 Tests

Verwendungszweck

Der indirekte Immunfluoreszenz-Assay (IFA) für IgM-Antikörper gegen das menschliche Herpesvirus 6 Antigen (HHV6) von SCIMEDX Corp. dient zum qualitativen und semi-quantitativen Nachweis von IgM (Immunglobulin M) Antikörpern gegen HHV6 in Humanserum oder Plasma. Der Nachweis von HHV6 IgM-Antikörpern beim Menschen kann verwendet werden, um die Diagnose einer primären Infektion mit dem Virus zu erleichtern.

Einführung und Übersicht über die Testverfahren

Das menschliche Herpesvirus 6 (HHV6) ist ein weit verbreitetes lymphotropes Virus beim Menschen, das zuerst bei immunosupprimierten Personen und Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen isoliert wurde. Es handelt sich um ein DNA-Virus, das ursprünglich als „humanes B-lymphotropes Virus“ (HBLV) bezeichnet, inzwischen jedoch als Mitglied der Familie menschlicher Herpesviren klassifiziert wurde. (1-2)

HHV6 unterscheidet sich genetisch und serologisch von den anderen bekannten humanen Herpesviren. (2-4) Serologische Studien anhand indirekter Immunfluoreszenz-Assays (IFA) haben gezeigt, dass Antikörper gegen das Virus in der allgemeinen Population häufig vorkommen. Die primäre Infektion mit HHV6 erfolgt gewöhnlich vor dem Alter von zwei Jahren. Ein hoher Anteil der menschlichen Population im Alter von über einem Jahr ist seropositiv für Anti-HHV6-Antikörper. (4-6) Eine primäre Infektion bei Erwachsenen ist aufgrund der hohen Infektionsrate in der Kindheit selten. Normalerweise führt eine primäre Infektion bei gesunden Erwachsenen zu einer leichten Erkrankung. Bei immungeschwächten Patienten oder Patienten, die ein Organ- oder Knochenmarkstransplantat erhalten, können jedoch ernsthafte Komplikationen eintreten. (4)

HHV6 wurde als Verursacher von *Roseola infantum* identifiziert, das auch als *Dreitagefieber* bezeichnet wird. Das Virus wurde bei Kindern mit *Dreitagefieber* isoliert und die Beziehung durch serologische Studien weiter untermauert. (7-9)

Roseola infantum gilt als gutartige, nicht saisonale Kinderkrankheit. Klinische Indikationen sind Ausschlag und Fieber. Babys sind durch Antikörper von der Mutter geschützt. Daher tritt die Infektion am häufigsten zwischen dem Alter von 6 und 18 Monaten ein. Serologische Informationen sind hilfreich bei der Diagnose, da der Nachweis von Antikörpern mittels IFA-Technik sowohl sensitiv als auch spezifisch ist, ohne eine Kreuzreaktion mit anderen menschlichen Herpesviren. (3,5,10,11-13)

Testprinzip

Die Immunfluoreszenz-Antikörpertests von SCIMEDX Corp. verwenden die indirekte Methode zum Nachweis von Antikörpern und zur Titerbestimmung. Patientenserum- oder Plasmaproben werden in Zellkulturen mit inaktivierten Viren-Antigenen gegeben, die sich in farbmarkierten Kavitäten auf Glas-Objektträgern befinden. Während der Inkubationszeit von 60 Minuten bilden für HHV6-Antigene typische Antikörper einen Antigen-/Antikörperkomplex mit den HHV6-Antigenen in den infizierten Zellen. Unspezifische Antikörper und andere freie Serumproteine werden in einem kurzen Waschvorgang entfernt. Fluoreszein-konjugiertes Antihuman-IgM von der Ziege wird dann in die Kavitäten auf dem Glas-Objektträger gegeben. Das Anti-IgM-Konjugat vermischt sich während der 30-minütigen Inkubationszeit mit Human-IgM (falls vorhanden). Nach einem kurzen Waschvorgang zur Entfernung von freiem Konjugat werden die Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Eine positive Antikörperreaktion wird durch leuchtend grüne Fluoreszenz an den Antigenstellen charakterisiert.

Bestandteile des Testkits und Lagerbedingungen

HHV6-Antigen-Objektträger: Objektträger mit menschlichen Lymphozyten, die mit HHV6 infiziert sind, auf jeder Glaskavität. Die Objektträger sind gebrauchsfertig, sobald sie aus dem Beutel entfernt werden. Bei 2–8 °C lagern. Bei diesen Lagerbedingungen sind die Objektträger bis zum auf dem Beutelticket angegebenen Verfallsdatum stabil.

HHV6 IgM positive Kontrolle: Jedes Fläschchen enthält 0,5 ml HHV6 IgM-Antikörper-positive Humankontrolle. Diese Komponente ist eine gebrauchsfertige Flüssigkeit. Bei 2–8 °C lagern. Bei diesen Lagerbedingungen ist die flüssige positive Kontrolle bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

HHV6 IgM negative Kontrolle: Jedes Fläschchen enthält 0,5 ml HHV6 IgM-Antikörper-negative Humankontrolle. Diese Komponente ist eine gebrauchsfertige Flüssigkeit. Bei 2–8 °C lagern. Bei diesen Lagerbedingungen ist die flüssige negative Kontrolle bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Fluoreszein-Konjugat: Jedes Fläschchen enthält 1,5 ml Fluoreszein-konjugiertes (inaktiviertes) Antihuman-IgM von der Ziege (μ kettenpezifisch) mit Evans Blue- und Rhodamin-Gegenfärbung. Das Fluoreszein-Konjugat ist eine Konjugation aus mithilfe von Affinitätschromatographie gereinigtem Antihuman-IgM und Fluoreszein-Isotiocyanat (FITC). Durch Hinzufügen von Evans Blue- und Rhodamin-Gegenfärbung zum Konjugat wird die nicht spezifische Fluoreszenz der Gewebekulturzellen maskiert. Diese Komponente ist eine gebrauchsfertige Flüssigkeit. Bei 2–8 °C lagern. Bei diesen Lagerbedingungen ist das flüssige Konjugat bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Deckglas-Eindeckmittel: Jedes Fläschchen enthält 2,0 ml phosphatgepuffertes Glycerol mit Verblässungsschutz. Diese Komponente ist eine gebrauchsfertige Flüssigkeit. Lagertemperatur: Kühlschrank bis Zimmertemperatur (2–30 °C). Bei diesen Lagerbedingungen ist das Eindeckmittel bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): Jedes versiegelte aluminiumierte Päckchen mit Pulverpuffer reicht für 1 Liter 1x PBS aus. Lagertemperatur: Kühlschrank bis Zimmertemperatur (2–30 °C). Den gesamten Inhalt eines PBS-Päckchens in 1 Liter frisch zubereitetes destilliertes oder deionisiertes Wasser geben. Hinweis: Schnelles Umrühren beim Hinzugeben der Salze erleichtert die Solubilisierung. PBS-Lösung bei 2–8 °C aufbewahren.

Spezielles Löschpapier: Saugfähiges Löschpapier hat vorgestanzte Löcher zum Trocknen der Objektträgermaske. Lagertemperatur: Kühlschrank bis Zimmertemperatur (2–30 °C).

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

IFA-Testkit: Kein US-Standard für Stärke.

- Alle Komponenten des Kits bei der empfohlenen Lagertemperatur aufbewahren. **Nicht einfrieren.**

- Komponenten nicht verwenden, wenn das Verfallsdatum überschritten ist.
- SCIMEDX stellt alle aktiven Komponenten in jeder Charge der SCIMEDX IFA-Kits als eine optimierte Einheit zusammen. Komponenten von verschiedenen Chargen oder Quellen dürfen nicht zusammen verwendet werden.
- Die Kontrollen und das Konjugat enthalten 0,095 % Natriumazid, das in Blei- bzw. Kupferleitungen explosive Verbindungen bilden kann, wenn es sich ansammelt. Wenn derartige Stoffe im Abfluss entsorgt werden, gründlich nachspülen.
- Verwenden Sie getrennte Pipette-Tips für jede Probe und Reagenz zu treffen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Reagenzien geprüft werden sollen auf Anzeichen von Bakterien- oder Pilzbefall.
- Antigen-Objektträger:** Die Zellen auf allen IFA Antigen-Objektträgern sind fixiert und enthalten kein lebensfähiges infektiöses Material. Gute Laborpraxis (GLP) erfordert jedoch die gleiche umsichtige Handhabung und Entsorgung der Objektträger wie bei allen anderen potenziellen biologischen Gefahrstoffen im Labor.
 - Die Objektträger erst kurz vor Gebrauch aus dem Schutzbeutel nehmen.
 - Nicht wiederverwenden Objektträger.

Humankontrollen: Die Humankontrollen in diesen Kits wurden alle mit von der FDA zugelassenen Methoden auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HbsAg) und auf Antikörper gegen das humane Immunschwächevirus (HIV) getestet und für nicht reaktiv befunden. Kein Testsystem kann jedoch die Abwesenheit dieser Erreger garantieren. Daher sind alle Humanserumkomponenten, einschließlich der Proben, die Ihr Labor zum Testen erhält, als potenzielle biologische Gefahrstoffe zu handhaben.

Xn – gefährlicher Stoff

Sicherheitsvorkehrungen für Kontrollen und Konjugat:

Die Natriumazid-Konzentration in diesen Komponenten ist als gefährlich klassifiziert und unterliegt den folgenden Gefahrenhinweisen: „Gesundheitsschädlich beim Verschlucken“ und „Entwickelt bei Berührung mit Säure hochgiftige Gase“.

Komponente	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Sicherheitshinweis Prävention: P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen. P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Antwort: P305+P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P337+P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
Piktogramm		
Signalwort	ACHTUNG	
Gefahrenhinweis	H319 Verursacht schwere Augenreizung.	

Entnahme, Lagerung und Einschränkungen der Testproben

- Das mit aseptischer Technik entnommene Serum oder Plasma von den roten Blutkörperchen trennen und einfrieren (–10 °C oder kälter), bis es getestet wird. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.
- Frische flüssige Serum- oder Plasmaproben können bei Bedarf maximal eine Woche lang bei 2–8 °C aufbewahrt werden, ohne dass die Aktivität der Antikörper beeinträchtigt wird.
- Stark lipämische Proben müssen vor Verwendung delipidiert werden.
- Keine kontaminierten Proben verwenden.
- SCIMEDX empfiehlt für Testzwecke Screening-Verdünnungen von 1:10 und 1:40, es sei denn, interferierendes IgG wird durch eine Vorbehandlung entfernt. Wenn das Serum vorbehandelt wird, reicht eine Verdünnung von 1:10 für die Tests aus. SCIMEDX bietet ein Vorbehandlungsmittel an. Zusätzliche Informationen hierzu erhalten Sie beim Kundendienst.

Zusätzlich erforderliche Materialien

- Reagenzgläser, Gestelle, Pipetten, Mikrotiterplatten und Sicherheits-Pipettiervorrichtungen zur Herstellung der Probenverdünnungen.
- Inkubator, 37 °C
- Feuchte Kammer zur Inkubation der Objektträger
- Objektträgergestell und Färbeschale zum Waschen der Objektträger
- Deckgläser: 22 x 50 mm, Glas Stärke 1

Fluoreszenzmikroskop: Ein Fluoreszenzmikroskop mit folgender Ausrüstung wurde zur Kalibrierung von Kontrollen und Konjugat verwendet:

- 10x Okular
- 16x oder 40x Objektiv
- Epi-Illuminator mit 50-W-Halogenlampe
- FITC-Erregerfilter KP490
- Gelb-Absorptionsfilter K530
- Rot-Sperrfilter BG38

Die Erregungsspitze der Fluoreszein-Markierung liegt bei 490 nm und die Emissionsspitze bei 520 nm. Unterschiede in Endpunkt-Reaktivität und Fluoreszenz-Intensität können auf Art und Zustand der im jeweiligen Labor verwendeten Fluoreszenzgeräte zurückzuführen sein.

IFA-Verfahren

- Für einen IgM-Antikörper-Nachweis eine Screening-Lösung im Verhältnis 1:10 und 1:40 für jede Probe in phosphatgepufferter Kochsalzlösung herstellen. Alle Verdünnungen in einem Mindestvolumen von 0,10 ml mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel herstellen. Falls die Proben zur Entfernung von IgG vorbehandelt wurden, reicht eine Verdünnung von 1:10 aus. SCIMEDX bietet ein Vorbehandlungsmittel an, mit dem IgG mit dem folgenden Verfahren entfernt werden kann. 45 µl Reagenz in 5 µl Probe geben und gründlich mischen. Die resultierende Verdünnung von 1:10 kann sofort verwendet werden. Es kann eine Präzipitation eintreten, die die IFA-Testergebnisse jedoch nicht beeinträchtigt.
- Die Objektträger aus dem Schutzbeutel nehmen und 1 Tropfen (ca. 20 µl) der verdünnten Proben in jede Kavität geben. Ausreichend Flüssigkeit zugeben, um alle Kavitäten zu füllen. Der Inhalt der Kavitäten darf sich jedoch nicht vermischen. Hinweis: Der tägliche Testlauf erfordert je eine Kavität für die positive Kontrolle, negative Kontrolle und PBS (Konjugatkontrolle).
- Die Objektträger 60 Minuten lang bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- Die Objektträger in einem dünnen Strahl Pufferlösung spülen. Den Strahl nicht direkt auf die Kavitäten richten.
- Die Objektträger 10 Minuten lang waschen. Dabei die PBS-Lösung nach 5 Minuten wechseln. Die Objektträger mit dem Gestell in der Pufferlösung auf und ab bewegen.
- Die Farbmaske um die Kavitäten mit dem im Kit enthaltenen speziellen Löschpapier abtupfen.

7. Einen Tropfen des gebrauchsfertigen Konjugats in jede Kavität geben.
8. Die Objektträger 30 Minuten lang bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
9. Die Schritte 4 (PBS-Spülung), 5 (10-minütige PBS-Wäsche) und 6 (Abtupfen) wiederholen.
10. Das Glycerol-Eindeckmittel und das Deckglas (22 x 50 mm) anbringen, um die Kavitäten des Objektträgers abzudecken.
11. Die Reaktivität bei 20- bis 40-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachten. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die Objektträger direkt nach Abschluss des Tests untersucht werden. Für gleichwertige Ergebnisse die Objektträger versiegelt oder feucht aufbewahren, um den Feuchtigkeitsverlust des Eindeckmittels zu minimieren. Im Dunkeln bei 2-8 °C lagern und innerhalb von drei Tagen die Ergebnisse ablesen. Eine positive Reaktivität kann durch eine intensive bis schwache Fluoreszenz gekennzeichnet sein. Die Fluoreszenzreaktion nach der folgenden Intensitätsskala bewerten: 4* (intensiv), 3* (leuchtend), 2* (mäßig), 1* (schwach).

Auswertung der Ergebnisse

- Eine leuchtend grüne fluoreszierende Färbung der infizierten Zellen weist auf eine HHV6 IgM-Antikörper-positive Reaktion hin. Das fluoreszierende Färbemuster ist bei mit HHV6 infizierten Zellen unterschiedlich. Je nach Infektionsstadium der Zelle kann das fluoreszierende Muster nur einen geringen Teil der Zelle bis zur gesamten Zelle ausmachen. Die Fluoreszenz kann außerdem von granulär bis homogen reichen. Zur internen Kontrolle enthält jede Kavität auf dem Objektträger sowohl mit HHV6 infizierte als auch nicht infizierte Zellen. Der Objektträger wird mit Absicht so zubereitet. Die nicht infizierten Zellen werden von der Gegenfärbung rot gefärbt und dienen als kontrastierender Hintergrund. Die Infektiosität der Zellen liegt zwischen 20 % und 60 %. Eine Titrierung der positiven HHV6 IgM-Seren ist nur dann nötig, wenn interferierende Antikörper minimiert oder quantitative Informationen gesammelt werden sollen. In einer Titrierungsserie gilt die höchste Serumverdünnung, bei der eine Reaktion von 1* eintritt, als Endpunkt.
- Die Abwesenheit einer spezifischen fluoreszierenden Färbung der infizierten Zellen weist auf eine HHV6 IgM-Antikörper-negative Reaktion hin.

Bedeutung der Auswertung

1. Keine feststellbare Fluoreszenz der infizierten Zellen mit den Screening-Lösungen	1. Probe ist HHV6 IgM-Antikörper-negativ.
2. Spezifische positive Fluoreszenz der infizierten Zellen mit beiden Screening-Lösungen	2. Probe ist HHV6 IgM-Antikörper-positiv. Dies weist auf eine frische Infektion hin.
3. Fluoreszenz sowohl bei infizierten als auch nicht infizierten Zellen	3. Die Probe weist eine unspezifische Reaktion auf.

Qualitätskontrolle

1. Zur Überprüfung der ordnungsgemäßen Funktion des Tests mindestens einmal täglich die positive und negative Kontrolle verwenden.
2. Art und Alter des Fluoreszenzmikroskops sowie die Betriebsstunden der UV-Lampe können die Fluoreszenzintensität und die Titrierungs-Endpunkte bis zu einem gewissen Grad beeinflussen. Die in diesem Kit enthaltene HHV6-Antikörper-positive Kontrolle wird in abgepackt, die eine Intensitätsreaktion von 2* bis 4* aufweist. Auf dem Fläschchen ist ein Titer angegeben, der als zusätzliche Prüfung für das Testsystem verwendet werden kann (siehe 1* Verdünnungshinweis). Dieser ist als Kalibrator für die 2* to 4* Intensitätsreaktion auf Ihrem Mikroskop zu verwenden.
3. Die im Kit enthaltene HHV6-Antikörper-negative Kontrolle als Kalibrator für eine negative Reaktion mit Ihrer Ausrüstung verwenden.
4. Der tägliche Testlauf sollte eine PBS-Kavität anstelle einer Probe enthalten. Dies ist eine Konjugatkontrolle, mit der gewährleistet wird, dass das Konjugat nicht mit dem Zells substrat reagiert.

1* Verdünnungshinweis

Diese positive Kontrolle in diesem Kit ist bereit, einen 3* und 4* Fluoreszenzintensität zu bedienen und bietet, wenn getestet. Um eine Fluoreszenzintensität von 1* zu erhalten, eine zweifache Verdünnung mit dem Titer herstellen, der auf dem in diesem Kit enthaltenen Fläschchen angegeben ist. Die positive Kontrolle beim ersten Gebrauch des Kits titrieren. Der beim Test erhaltene Titer kann sich aus mehreren technischen Gründen vom angegebenen Endpunkt-Titer unterscheiden. Es ist am besten, den auf dem Fläschchen angegebenen Titer zu verwenden sowie die zweifache Verdünnung direkt vor und nach dem angegebenen Titer. Für einen Endpunkt-Titer (1*) erzielte Ergebnisse sind normalerweise für verschiedene Labors unterschiedlich. Dies liegt an Faktoren, die die Fluoreszenzintensität beeinflussen. Diese Faktoren sind u. a.:

1. die Nennleistung der UV-Lichtquelle im Mikroskop
2. die Art der Lichtquelle
3. das Alter der Lampe
4. die Länge des optischen Pfads im Mikroskop und die Art der verwendeten optischen Filter
5. die Genauigkeit der Verdünnungstechniken und die verwendete Ausrüstung

Einschränkungen des Verfahrens

1. Ein serologischer Test wie z. B. ein IFA-Test dient als Hilfe beim Nachweis einer Virusinfektion, sollte jedoch nicht als einziges Kriterium verwendet werden. Die Testergebnisse sind in Verbindung mit vom Patienten zur Verfügung gestellten Informationen, einer klinischen Beurteilung sowie anderen verfügbaren Diagnoseverfahren zu verwenden.
2. Unspezifische positive Reaktionen wie z. B. antinukleäre und/oder antizytoplasmatische Antikörperreaktionen können in Proben von Patienten mit bestimmten Autoimmunerkrankungen auftreten. Sowohl infizierte als auch nicht infizierte Zellen fluoreszieren. Dies kann eine positive HHV6-Reaktion verdecken. Daher schließt das Auftreten einer Autoimmunreaktion nicht die Möglichkeit einer HHV6-Infektion aus.
3. SCIMEDX empfiehlt die Vorbehandlung der Proben zum Entfernen von IgG-Antikörpern. Dieser zusätzliche Schritt hilft, falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse zu eliminieren. Wenn IgG-Antikörper mit IgM-Antikörpern um bestimmte Bindungsstellen konkurrieren, kann IgG zu einem falsch-negativen Ergebnis führen. Wenn IgG-Antikörper Immunkomplexe mit Antigen-Substrat bilden, das dann Rheumafaktor (IgM-Klasse) binden kann, können die IgG-Antikörper zu falsch-positiven Ergebnissen führen.
4. Proben, die zu früh während der Infektion entnommen wurden, enthalten evtl. keine nachweisbaren IgM-Antikörper. Wenn eine Virusinfektion vermutet wird, sollte eine zweite Probe 7-14 Tage später entnommen werden. Die zweite Probe sollte gleichzeitig mit der ersten Probe auf Serokonversion oder einen signifikanten Titeranstieg des viruspezifischen IgM oder IgG getestet werden. Eine Serokonversion oder ein signifikanter Titeranstieg weist auf eine primäre Infektion hin.
5. Da das Blut in der Nabelschnur durch IgM von der Mutter kontaminiert werden kann, wird empfohlen, positive Virus-IgM-Antikörperergebnisse direkt an Blutproben von der Nabelschnur zu bestätigen. Hierzu wird eine erneute Probe vom Baby getestet, wenn möglich in den ersten fünf Lebenstagen. (14)

6. Spezifische IgM-Antikörper lassen sich gewöhnlich bei Patienten mit kürzlich erfolgter primärer Infektion nachweisen. IgM-Antikörper lassen sich bei Patienten mit reaktivierten oder sekundären Infektionen nachweisen oder in Patienten, die keine nachweisbaren Anzeichen einer kürzlich erfolgten Infektion aufweisen. (15)

Leistungscharakteristika

Relative Sensitivität und Spezifität: Das HHV6 IgM IFA-Kit von SCIMEDX wurde im Vergleich mit einem im Handel erhältlichen HHV6 IgM ELISA-Test bewertet. Bei der Studie wurden neunzehn tiefgefrorene Proben in einem kommerziellen klinischen Labor getestet. Die Gesamt-Übereinstimmung betrug 18/19 bzw. 94,7 %. Die untenstehende Tabelle enthält eine Zusammenfassung der Daten.

SCIMEDX IFA				
Alternativer ELISA-Test	HHV6 IgM-Status	Reaktiv	Nicht reaktiv	Gesamt
	Reaktiv	5	0	5
	Nicht reaktiv	1	13	14
	Gesamt	6	13	19

Reproduzierbarkeit: Vier seropositive Seren mit unterschiedlichen Titern (1:10 bis 1:80) sowie sechs seronegative Seren wurden nacheinander zweifach verdünnt und dreimal mit drei verschiedenen Assays getestet. Der Endpunkt wurde bestimmt. Alle dreißig Endpunkt-Titer lagen innerhalb der Spezifikationen für ± eine zweifache Verdünnung.

Identischer Titer	28/30
± eine zweifache Verdünnung	2/30

Spezifität: Dreizehn Seren mit Antikörperaktivität gegen Krankheiten, die möglicherweise eine Kreuzreaktion mit HHV6 IgM aufweisen können, wurden mit dem IFA-Kit getestet. Es wurde bei keiner der Proben eine Kreuzreaktivität beobachtet. Siehe folgende Tabelle.

Daten zur Kreuzreaktivität: SCIMEDX HHV6 IgM-Test

Art der Erkrankung	Proben gesamt	Positives Ergebnis
Zytomegalievirus	4	0/4
Epstein-Barr-Virus	3	0/3
Herpes-simplex-Virus 1	4	0/4
Varicella-Zoster-Virus	2	0/2
Gesamt	13	0/13

Echtzeitstabilität: Die Echtzeitstabilität der Komponenten des Kits wurde mindestens 24 Monate lang in Abständen von 6 Monaten getestet. Der Endpunkt-Titer der positiven und negativen Kontrollen wurde mit den anfänglichen Endpunkt-Titern verglichen. Akzeptabel sind Endpunkt-Titer innerhalb einer zweifachen Verdünnung voneinander. Diese Ergebnisse lagen innerhalb der Spezifikationen.

Echtzeitstabilität

Objektträger -Charge	Kontrolle	Anfänglicher Endpunkt-Titer	Endpunkt-Titer nach 24 Monaten
Nr. 1	Positiv	1:40	1:20
	Negativ	–	–
Nr. 2	Positiv	1:40	1:20
	Negativ	–	–
Nr. 3	Positiv	1:40	1:20
	Negativ	–	–

Literaturnachweis

1. Salahuddin, A.K., D.V. Ablashi, P.D. Markham, S.F. Josephs, S. Sturzenegger, M. Kaplan, G. Halligan, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, B. Kramarsky, and R.C. Gallo. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 234:596-601.
2. Josephs, S.F., S.Z. Salahuddin, D.V. Ablashi, F. Schacter, F. Wong-Staal, and R. C. Gallo. 1986. Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science*. 234:601-603.
3. Ablashi, D.V., S.F. Josephs, A. Buchbinder, K. Hellman, S. Nakamura, T. Liana, P. Lusso, M. Kaplan, J. Dahlberg, S. Memon, F. Imam, K.L. Ablashi, P.D. Markham, B. Kramarsky, G.R.F. Krueger, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, S.Z. Salahuddin, and R.C. Gallo. 1988. Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus 6). *J. Virol. Methods*. 21:29-48.
4. Stewart, J.A. 1990. Human herpesvirus 6: basic biology and clinical associations. In L.M. de la Maja and E. M. Peterson (ed.), *Medical virology*, Vol. 9. Plenum Press, New York.
5. Linde, A., H. Dahl, B. Wahren, E. Fridell, Z. Salahuddin, and P. Biberfeld. 1988. IgG antibodies to human herpesvirus 6 in children and adults both in primary Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections. *J. Virol. Methods*. 21:117-123.
6. Briggs, M., J. Fox, and R.S. Tedder. 1988. Age prevalence of antibody to human herpesvirus 6. *Lancet*. i:396.
7. Yamanishi, K., T. Okuno, K. Shiraki, M. Tarahashi, T. Kando, Y. Asano, and T. Kurata. 1988. Identification of human herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. i:1065-1067.
8. Takahishi, K., S. Smoda, K. Kawakami, K. Migata, T. Oki, and T. Nagata. 1988. Human herpesvirus 6 and exanthem subitum. *Lancet*. i:1463.
9. Ueda, K., K. Kusuhara, M. Hirase, K. Okada, C. Migajaki, K. Tokugawa, M. Nakagawa, and K. Yamanishi. 1989. Exanthem subitum and antibody to human herpesvirus 6. *J. Infect. Dis.* 159:750-752.
10. Irving, W.L., and A.L. Cunningham. 1990. Serological diagnosis of infection with human herpesvirus type 6. *Br. Med. J.* 300:158-159.
11. Linnavouri, K., H. Peltola, and T. Hovi. 1992. Serology versus clinical signs or symptoms and main laboratory findings in the diagnosis of exanthem subitum (roseola infantum). *Pediatrics*. 89:103-106.
12. Pruksananonda, P., C.B. Hall, R.A. Insul, K. McIntyre, P.E. Pellett, C.E. Long, K.C. Schnabel, P.H. Pincus, F.R. Stamey, T.R. Dambaugh, and J.A. Stewart. 1992. Primary human herpesvirus 6 infections in young children. *N. Engl. J. Med.* 326:1445-1450.
13. Hall, C.B., C.E. Long, K.C. Schnabel, M.T. Caserta, K.M. McIntyre, M.A. Costanzo, A. Knott, S. Dewhurst, R.A. Insul, and L.G. Epstein. 1994. Human herpesvirus 6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N. Engl. J. Med.* 331:432-438.
14. Schmidt, N.J. 1984. Update on class-specific viral antibody assays. *Clin. Immunol. Newsl.* 5: 81-85.
15. Krueger, G.R.F., D.V. Ablashi, S.F. Joseph, S.Z. Salahuddin, U. Lemke, A. Ramon, and G. Bertram. 1991. Clinical indications and diagnostic techniques of human herpesvirus-6 (HHV6) infection. *In Vivo*. 5:287-296.

SCIMEDX CORPORATION
53 Highbrooklyn Rd
Dover, NJ 07801 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8796
www.scimedx.com

EC	REP	Medimark Europe 11, rue Zola – BP 2332 F-38033 Grenoble Cedex 2 - France
----	-----	--





SAGGIO A FLUORESCENZA INDIRETTA PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI IgM CONTRO L'HERPESVIRUS UMANO 6 (HHV6)

Solo per l'esportazione

Per uso diagnostico in vitro.

I-HV601M	120 Tests
I-HV602M	40 Tests
I-HV603M	40 Tests

Uso previsto

Il saggio a fluorescenza indiretta (IFA) SCIMEDX Corp. per la determinazione degli anticorpi IgM contro l'herpesvirus umano 6 (HHV6) è destinato al rilevamento qualitativo e semiquantitativo degli anticorpi IgM (immunoglobuline M) contro l'HHV6 nel siero o nel plasma umano. La determinazione di anticorpi IgM anti-HHV6 in campioni umani può essere utilizzata come ausilio nella diagnosi dell'infezione primaria con tale virus.

Introduzione e riepilogo delle procedure d'analisi

L'herpesvirus umano 6 (HHV6) è un virus linfotropico umano, isolato per la prima volta da individui immunosoppressi e pazienti affetti da patologie linfoproliferative. Si tratta di un virus DNA, originariamente chiamato virus linfotropico umano B (HBLV), attualmente classificato come appartenente alla famiglia degli herpesvirus umani (1-2).

HHV6 si differenzia geneticamente e sierologicamente dagli altri herpesvirus umani noti (2-4). Studi sierologici, effettuati tramite il saggio a fluorescenza indiretta (IFA), hanno dimostrato che l'anticorpo contro il virus è comune nella popolazione generale. L'infezione primaria da HHV6 ha luogo generalmente prima del secondo anno di vita. Un'elevata percentuale di individui di età superiore ad un anno risulta sieropositiva all'anticorpo anti-HHV6 (4-6). L'infezione primaria negli adulti è rara a causa dell'elevato tasso di infezione nell'infanzia. Mentre negli adulti sani l'infezione primaria provoca generalmente un leggero malessere, complicazioni più gravi possono insorgere in pazienti immunocompromessi o soggetti a trapianto di organi o midollo osseo (4).

L'HHV6 è stato identificato come agente responsabile della rosolia infantile, chiamata anche exanthem subitum. Il virus è stato isolato da bambini affetti da exanthem subitum e l'associazione è stata ulteriormente supportata da studi sierologici (7-9).

La rosolia infantile viene considerata una malattia infantile benigna non stagionale con indicazioni cliniche di esantema e febbre. I neonati sono protetti dagli anticorpi materni, pertanto l'infezione è più frequente tra i 6 e i 18 mesi di vita. Le informazioni sierologiche sono utili nella diagnosi in quanto il rilevamento dell'anticorpo tramite la tecnica IFA è sia sensibile che specifico, senza reazione crociata con altri herpesvirus umani (3,5,10,11-13).

Principio del test

I saggi con anticorpo fluorescente SCIMEDX Corp. usano il metodo indiretto per il rilevamento degli anticorpi e la determinazione del titolo. I campioni di siero o di plasma del paziente sono aggiunti alle cellule in coltura contenenti gli antigeni virali inattivati e fissate su pozzetti, distinguibili grazie alla maschera, su vetrini per microscopio. Durante un'incubazione di 60 minuti, l'anticorpo specifico per gli antigeni dell'HHV6 forma un complesso antigene/anticorpo con gli antigeni dell'HHV6 nelle cellule infette. Con una breve fase di lavaggio sono eliminati l'anticorpo non specifico e altre proteine sieriche che non hanno reagito. L'anticorpo di capra anti-IgM umane coniugato con fluoresceina è quindi applicato ai pozzetti del vetrino. Il coniugato anti-IgM si combina con le IgM umane presenti durante un'incubazione di 30 minuti. Dopo un breve lavaggio per rimuovere il coniugato che non ha reagito, i vetrini sono osservati in microscopia a fluorescenza. La fluorescenza verde brillante nei siti degli antigeni indica una reazione positiva dell'anticorpo.

Materiali forniti e condizioni di conservazione

Vetrini dell'antigene HHV6: vetrini con linfociti umani infettati da HHV6 su ogni pozzetto. Una volta tolti dal sacchetto di protezione, i vetrini sono pronti per l'uso. Conservare a 2-8°C; in questa condizione di conservazione i vetrini sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del sacchetto.

Controllo positivo per IgM anti-HHV6: ogni fiala contiene 0,5 ml di controllo umano positivo per anticorpo IgM anti-HHV6. Questo componente è un liquido pronto per l'uso. Conservare a 2-8°C; in questa condizione di conservazione il controllo positivo liquido è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala.

Controllo negativo per IgM anti-HHV6: ogni fiala contiene 0,5 ml di controllo umano negativo per anticorpo IgM anti-HHV6. Questo componente è un liquido pronto per l'uso. Conservare a 2-8°C; in questa condizione di conservazione il controllo negativo liquido è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala.

Coniugato con fluoresceina: ogni fiala contiene 1,5 ml di IgM anti-umana (inattivata) di capra (specificata per catene μ) coniugata con fluoresceina con coloranti di contrasto blu Evans e rodamina. Il coniugato con fluoresceina è un complesso costituito da IgM anti-umane purificate con cromatografia per affinità e isotiocianato di fluoresceina (FITC). L'aggiunta dei coloranti di contrasto blu Evans e rodamina al coniugato maschera la fluorescenza non specifica delle cellule della coltura tissutale. Questo componente è un liquido pronto per l'uso. Conservare a 2-8°C; in questa condizione di conservazione il coniugato liquido è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala.

Mezzo di montaggio per vetrino coprioggetto: ogni fiala contiene 2,0 ml di glicerolo in tampone fosfato con ritardante della dissoluzione. Questo componente è un liquido pronto per l'uso. La temperatura di conservazione può variare tra la temperatura refrigerata e la temperatura ambiente (2-30°C). Il mezzo di montaggio è stabile in entrambe le condizioni di conservazione fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala.

Soluzione salina in tampone fosfato (PBS): ogni confezione sigillata, rivestita in alluminio di tampone in polvere da un litro di PBS 1X. Le temperature di conservazione possono variare tra la temperatura refrigerata e la temperatura ambiente (2-30°C). Aggiungere l'intero contenuto di una confezione di PBS a un litro di acqua distillata o deionizzata preparata al momento. Attenzione: per facilitare la solubilizzazione, aggiungere i sali mentre si agita velocemente l'acqua. Conservare la PBS in soluzione a 2-8°C.

Tamponi di carta assorbente speciali: i tamponi di carta assorbente presentano fori pretagliati da utilizzare per asciugare la maschera del vetrino. Le temperature di conservazione possono variare tra la temperatura refrigerata e la temperatura ambiente (2-30°C).

Precauzioni generali

Kit per il test IFA: nessuno standard statunitense di efficienza.

- Conservare ogni componente del kit alle temperature suggerite o raccomandate. **Non congelare.**

- Non utilizzare i componenti dopo la data di scadenza indicata su ognuno di essi.
- SCIMEDX ottimizza tutti i componenti attivi di ogni lotto dei kit IFA come unità. Non mischiare componenti di diversi lotti o di diversi produttori.
- I controlli e il coniugato contengono sodio azide allo 0,095 % che, quando accumulato, può formare composti esplosivi a livello delle tubature in piombo o in rame. Per eliminare questi materiali, far scorrere abbondante acqua.
- Separare le punte della pipetta per ogni campione e dei reagenti per evitare la contaminazione incrociata.
- I reattivi devono essere controllati per la prova di contaminazione batterica o fungina.

Vetrini dell'antigene: tutti i vetrini dell'antigene per l'IFA hanno cellule fissate che non contengono agenti infettivi vitali. Tuttavia, le buone pratiche di laboratorio (GLP) richiedono un'attenta manipolazione ed eliminazione dei vetrini, come con ogni altro materiale di laboratorio a rischio biologico.

- Non rimuovere i vetrini dal loro sacchetto protettivo fino al momento dell'uso.
- Non riutilizzare vetrini con substrate

Controlli di materiale umano: i controlli di materiale umano in questi kit sono stati testati e trovati negativi per l'antigene di superficie dell'epatite B (HbsAg) e per l'anticorpo contro il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) con i metodi approvati dall'FDA. In ogni caso nessun sistema di analisi può assicurare l'assenza di questi agenti. Manipolare tutti i componenti del siero umano, inclusi quelli ricevuti nel laboratorio per il test, come materiale a potenziale rischio biologico.

☒ Xn - Sostanza nociva

Precauzioni di sicurezza per i controlli e il coniugato

La concentrazione di sodio azide in questi composti è classificata come "nociva" e soggetta alla seguente frase di rischio: "Nocivo per inalazione e a contatto con gli acidi libera gas molto tossici."

Componente	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Consiglio di prudenza
Pittogramma		Prevenzione: P264 Lavare accuratamente ... dopo l'uso. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. Risposta: P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. P337+P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
AVVERTENZA	ATTENZIONE	
Indicazione di Pericolo	H319 Provoca grave irritazione oculare.	

Raccolta dei campioni, conservazione e limiti dei campioni del test

- Separare asetticamente il siero o il plasma raccolto dagli eritrociti e conservarlo congelato (a -10°C o a temperature inferiori) fino al momento dell'analisi. Evitare di congelare e scongelare più volte.
- Se lo si desidera, si possono conservare i campioni di siero o di plasma freschi ad una temperatura compresa 2° e 8°C per una settimana, senza perdita dell'attività anticorpale.
- Non utilizzare campioni eccessivamente lipemici senza aver eseguito la rimozione dei lipidi.
- Non utilizzare campioni contaminati.
- SCIMEDX consiglia diluizioni di 1:10 e 1:40 a scopo di analisi a meno che non venga eseguita una fase di pre-trattamento per la rimozione delle IgG che causano interferenza. Se il siero viene pretrattato, è sufficiente una diluizione di analisi di 1:10. È disponibile un reagente di pretrattamento. Per ulteriori informazioni, contattare il servizio assistenza clienti.

Materiale richiesto, ma non fornito

- Provette per il test, portaprovette, pipette, piastre per microtitolazione e dispositivi di sicurezza per pipettare durante l'esecuzione delle diluizioni dei campioni
- Incubatore a 37°C
- Camera umida per incubare i vetrini
- Porta vetrini e bacinelle per il lavaggio dei vetrini
- Vetrini coprioggetto: vetrino di spessore n.1, 22 X 50 mm

Microscopio a fluorescenza: per calibrare i controlli e il coniugato è stato utilizzato un microscopio a fluorescenza attrezzato come segue:

- oculare 10x
- obiettivi 16x o 40x
- epi-illuminatore con lampada alogena da 50 W
- filtro di eccitazione per FITC KP490
- filtro di assorbimento del giallo K530
- filtro di soppressione del rosso BG38

La marcatura con fluoresceina ha un picco di eccitazione a 490 nm e un picco di emissione a 520 nm. Differenze nelle reattività dell'endpoint e nelle intensità di fluorescenza possono essere dovute al tipo e alla condizione dell'attrezzatura per fluorescenza utilizzata nel laboratorio.

Procedura di IFA

Per la determinazione di anticorpi IgM, preparare una diluizione di analisi di 1:10 e 1:40 in PBS per ogni campione da testare. Preparare tutte le diluizioni in un volume minimo di 0,10 ml con PBS come diluente. Per

- la rimozione delle IgG nei campioni pretrattati, è sufficiente una diluizione di 1:10. SCIMEDX può fornire un reagente di pretrattamento per l'eliminazione delle IgG conformemente alla seguente procedura: Aggiungere 45 μ l di reagente a 5 μ l di campione da testare e miscelare completamente. La diluizione di 1:10 risultante può essere utilizzata immediatamente. Può verificarsi una precipitazione, ma non interferirà con i risultati del test IFA.
- Togliere i vetrini dal sacchetto protettivo e applicare 1 goccia (circa 20 μ l) di campione o campioni diluiti da analizzare per ogni pozzetto. Aggiungere volume sufficiente a coprire completamente ogni pozzetto, ma evitando di mischiare i contenuti dei diversi pozzetti.

Attenzione: ogni esecuzione del test durante la giornata richiede un pozzetto per il controllo positivo, uno per il controllo negativo e uno per la PBS (controllo del coniugato).

- Incubare i vetrini in una camera umida per 60 minuti a 37°C.
- Risciacquare i vetrini con un flusso delicato di tampone, evitando di dirigere il flusso direttamente sui pozzetti.

- Lavare i vetrini per 10 minuti cambiando la soluzione di PBS dopo 5 minuti. Agitare i vetrini muovendo il portavetrini su e giù nel tampone.
- Asciugare la maschera colorata che circonda i pozzetti del test con gli speciali tamponi di carta assorbente forniti nel kit.
- Applicare una goccia del coniugato pronto per l'uso a ogni pozzetto del test.
- Incubare i vetrini in una camera umida per 30 minuti a 37°C.
- Ripetere i passaggi 4 (risciacquo con PBS), 5 (lavaggio di 10 minuti in PBS) e 6 (asciugatura).
- Applicare il mezzo di montaggio a base di glicerolo e il vetrino coprioggetto da 22 X 50 mm per coprire i pozzetti del vetrino.
- Osservare la reattività in microscopia a fluorescenza usando l'ingrandimento 20-40X. Per ottenere risultati migliori, esaminare i vetrini immediatamente dopo la conclusione del test. Per ottenere risultati equivalenti, sigillare i vetrini o conservarli in ambiente umido per evitare la disidratazione del mezzo di montaggio, conservare al buio a 2-8°C e leggere entro 3 giorni. La reattività positiva può dare un'intensità di fluorescenza che varia dal brillante al tenue. Classificare la reazione di fluorescenza secondo la seguente scala di intensità: 4⁺ (brillante), 3⁺ (luminosa), 2⁺ (moderata), 1⁺ (tenue).

Interpretazione dei risultati

- La colorazione delle cellule infette con una fluorescenza verde luminosa indica una reazione positiva per gli anticorpi IgM anti-HHV6. Il pattern di colorazione fluorescente delle cellule infette con HHV6 è variabile. In base allo stadio di infezione della cellula, il pattern fluorescente può variare dalla fluorescenza di una piccola porzione della cellula infetta alla fluorescenza dell'intera cellula infetta. La fluorescenza può anche variare da granulare a omogenea. Per fornire un controllo interno, ogni pozzetto del vetrino per microscopio contiene sia cellule infette che non infette con HHV6. La preparazione del vetrino in questo modo è intenzionale. Le cellule non infette, colorate di rosso con colorante di contrasto, forniscono un background del contrasto. L'intensità delle cellule varia dal 20 % al 60 %. La titolazione dei sieri positivi per IgM anti-HHV6 è necessaria solo per ridurre al minimo gli anticorpi interferenti o per fornire informazioni quantitative. In una sequenza di titolazione, l'endpoint è rappresentato dalla diluizione più alta del siero che dimostra una reazione 1⁺.
- L'assenza di colorazione fluorescente specifica delle cellule infette indica una reazione negativa per gli anticorpi IgM anti-HHV6.

Importanza dell'interpretazione

1. Non si riscontra alcuna fluorescenza distinguibile delle cellule infette alla diluizione di analisi.	1. Il campione del test è negativo per gli anticorpi IgM anti-HHV6.
2. Fluorescenza positiva specifica delle cellule infette alla diluizione di analisi.	2. Il campione del test è positivo per gli anticorpi IgM anti-HHV6, indicando l'infezione in corso.
3. Si riscontra fluorescenza sia nei campioni infetti che in quelli non infetti.	3. Il campione del test mostra una reazione non specifica.

Controllo di qualità

- Per assicurare che il test funzioni in modo corretto utilizzare i controlli positivo e negativo almeno una volta per ogni analisi di una giornata.
- Il tipo e l'età del microscopio a fluorescenza e le ore di utilizzo del bulbo UV possono influire sull'intensità della fluorescenza e sugli endpoint della titolazione. Il controllo positivo per gli anticorpi anti-HHV6 fornito con questo kit dà una reazione con intensità da 2⁺ a 4⁺. La fiala ha un titolo elencato per l'utilizzo come ulteriore controllo del sistema di analisi (vedere la nota per la diluizione 1⁺). Utilizzarla come calibratore della reazione a intensità da 2⁺ a 4⁺ con il microscopio in uso.
- Utilizzare il controllo negativo per gli anticorpi HHV6 fornito con questo kit come calibratore per una reazione negativa con l'attrezzatura in uso.
- Ogni test della giornata deve includere un pozzetto con PBS al posto del campione del test. Questo rappresenta il controllo del coniugato per assicurare che il coniugato non reagisca con il substrato cellulare.

Nota per la diluizione 1⁺

Il controllo positivo in questo kit è fornito pronto per l'uso per dare un'intensità di fluorescenza da 2⁺ a 4⁺, quando testato. Per ottenere un'intensità di fluorescenza pari a 1⁺, diluire due volte il titolo indicato sulla fiala inclusa in questo kit. Titolare il controllo positivo quando si utilizza un nuovo kit.

Il titolo ottenuto può differire dal titolo di endpoint indicato per varie ragioni tecniche. È meglio testare il titolo indicato sulla fiala e anche la doppia diluizione subito prima e subito dopo il titolo indicato. È normale che i risultati ottenuti per un titolo di endpoint (1⁺) differiscano tra i laboratori a causa di fattori che influiscono sull'intensità di fluorescenza, quali:

- la potenza della sorgente della luce UV nel microscopio
- il tipo di sorgente luminosa
- l'età della lampada
- la lunghezza del percorso ottico del microscopio e i tipi di filtri ottici utilizzati
- l'accuratezza delle tecniche di diluizione e l'attrezzatura per la diluizione.

Limiti della procedura

- Un test sierologico, come l'IFA, funge da ausilio nella determinazione dell'infezione virale, ma non deve essere l'unico criterio di valutazione. I risultati del test devono essere valutati insieme alle informazioni disponibili sul paziente, alla valutazione clinica e ai dati provenienti da altre procedure diagnostiche.
- Nei campioni di pazienti con alcune malattie autoimmuni si possono verificare reazioni positive non specifiche, quali reazioni degli anticorpi antinucleari e/o reazioni degli anticorpi anticitoplasmatici. Sia le cellule infette che quelle non infette possono presentare fluorescenza, nascondendo una reazione positiva per l'HHV6. Ne consegue che l'osservazione di una reazione autoimmune non può eliminare la possibilità di infezione dell'HHV6.
- SCIMEDX consiglia il pretrattamento dei campioni da esaminare allo scopo di eliminare gli anticorpi IgG. Questa fase aggiuntiva facilita l'eliminazione di risultati falsi negativi e falsi positivi. Quando l'anticorpo IgG compete con l'anticorpo IgM per siti di legame specifici, l'anticorpo IgG può produrre un risultato falso negativo. Quando l'anticorpo IgG forma immunocomplessi con il substrato antigenico che può in seguito legarsi al fattore reumatoide (classe IgM), l'anticorpo IgG può produrre un risultato falso positivo.
- Un campione ottenuto troppo in anticipo durante l'infezione può non contenere livelli rilevabili di anticorpo IgM. Se si sospetta un'infezione virale, è necessario ottenere un secondo campione dopo 7-14 giorni. Il secondo campione deve essere testato contemporaneamente al primo campione per rilevare la sieroconversione o un aumento significativo del titolo di IgM o IgG specifiche del virus. Sia la sieroconversione che un aumento significativo del titolo indicano la presenza di infezione primaria.
- Poiché esiste la possibilità di contaminazione del sangue del cordone con IgM materne, è prudente confermare i risultati positivi dell'anticorpo IgM virale nei campioni di sangue del cordone analizzando un campione di controllo dal neonato, preferibilmente entro i primi cinque giorni di vita (14).

- Gli anticorpi IgM specifici vengono generalmente rilevati in pazienti con infezione primaria recente. Gli anticorpi IgM possono essere presenti in pazienti con infezione riattivata o secondaria, o in pazienti senza altre prove rilevabili di infezione recente (15).

Caratteristiche prestazionali

Sensibilità e specificità relative: il kit IFA per la determinazione degli anticorpi IgM anti-HHV6 SCIMEDX Corp. è stato valutato rispetto a un test ELISA IgM anti-HHV6 disponibile sul mercato. Lo studio ha esaminato diciannove campioni congelati in un laboratorio clinico commerciale. La concordanza totale era 18/19 o del 94,7 %. La tabella seguente riepiloga i dati.

IFA SCIMEDX				
ELISA alternativo	Stato IgM anti-HHV6	Reattivo	Non reattivo	Totale
	Reattivo	5	0	5
	Non reattivo	1	13	14
	Totale	6	13	19

Riproducibilità: Quattro sieri sieropositivi con vari titoli (da 1:10 a 1:80) e sei sieri sieronegativi sono stati diluiti serialmente due volte e analizzati tre volte in tre diversi saggi ed è stato determinato l'endpoint. Tutti i trenta titoli di endpoint erano all'interno delle specifiche di $\pm$ una doppia diluizione.

Titolo identico	28/30
$\pm$ una, doppia diluizione	2/30

Specificità: Con questo kit IFA, sono stati testati tredici sieri con l'attività anticorpale verso le malattie che possono dare reattività crociata con IgM anti-HHV6. Non è stata osservata alcuna reattività crociata per nessun campione. Consultare la tabella seguente.

Dati di reattività crociata- IFA SCIMEDX per IgM anti-HHV6

Tipo di malattia	Campioni totali	Risultato positivo
Citomegalovirus	4	0/4
Virus di Epstein-Barr	3	0/3
Virus dell'herpes simplex di tipo 1	4	0/4
Virus della varicella-zoster	2	0/2
Totale	13	0/13

Stabilità in tempo reale: L'analisi della stabilità in tempo reale dei componenti del kit è stata eseguita a intervalli di 6 mesi per un minimo di 24 mesi. Il titolo di endpoint dei controlli positivo e negativo è stato confrontato con i titoli di endpoint al rilascio. I criteri di accettabilità per entrambi sono i titoli di endpoint entro una, due diluizioni. Questi risultati rientravano nelle specifiche.

Stabilità in tempo reale

Lotto del vetrino	Controllo	Titolo di endpoint al rilascio	Titolo di endpoint a 24 mesi
#1	Positivo	1:40	1:20
	Negativo	–	–
#2	Positivo	1:40	1:20
	Negativo	–	–
#3	Positivo	1:40	1:20
	Negativo	–	–

Riferimenti bibliografici citati

- Salahuddin, A.K., D.V. Ablashi, P.D. Markham, S.F. Josephs, S. Sturzenegger, M. Kaplan, G. Halligan, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, B. Kramsky, and R.C. Gallo. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 234:596-601.
- Josephs, S.F., S.Z. Salahuddin, D.V. Ablashi, F. Schacter, F. Wong-Staal, and R. C. Gallo. 1986. Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science*. 234:601-603.
- Ablashi, D.V., S.F. Josephs, A. Buchbinder, K. Hellman, S. Nakamura, T. Liana, P. Lusso, M. Kaplan, J. Dahlberg, S. Memon, F. Imam, K.L. Ablashi, P.D. Markham, B. Kramsky, G.R.F. Krueger, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, S.Z. Salahuddin, and R.C. Galo. 1988. Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus 6). *J. Virol. Methods*. 21:29-48.
- Stewart, J.A. 1990. Human herpesvirus 6: basic biology and clinical associations. *In* L.M. de la Maja and E. M. Peterson (ed.), *Medical virology*, Vol. 9. Plenum Press, New York.
- Linde, A., H. Dahl, B. Wahren, E. Fridell, Z. Salahuddin, and P. Biberfeld. 1988. IgG antibodies to human herpesvirus 6 in children and adults both in primary Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections. *J. Virol. Methods*. 21:117-123.
- Briggs, M., J. Fox, and R.S. Tedder. 1988. Age prevalence of antibody to human herpesvirus 6. *Lancet*. i:396.
- Yamanishi, K., T. Okuno, K. Shiraki, M. Tarahashi, T. Kando, Y. Asano, and T. Kurata. 1988. Identification of human herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. i:1065-1067.
- Takahishi, K., S. Smoda, K. Kawakami, K. Migata, T. Oki, and T. Nagata. 1988. Human herpesvirus 6 and exanthem subitum. *Lancet*. i:1463.
- Ueda, K., K. Kusuha, M. Hirase, K. Okada, C. Migajaki, K. Tokugawa, M. Nakagawa, and K. Yamanishi. 1989. Exanthem subitum and antibody to human herpesvirus 6. *J. Infect. Dis.* 159:750-752.
- Irving, W.L., and A.L. Cunningham. 1990. Serological diagnosis of infection with human herpesvirus type 6. *Br. Med. J.* 300:158-159.
- Linnavouri, K., H. Peitola, and T. Hovi. 1992. Serology versus clinical signs or symptoms and main laboratory findings in the diagnosis of exanthem subitum (roseola infantum). *Pediatrics*. 89:103-106.
- Pruksananonda, P., C.B. Hall, R.A. Insul, K. McIntyre, P.E. Pellett, C.E. Long, K.C. Schnabel, P.H. Pincus, F.R. Stamey, T.R. Dambaugh, and J.A. Stewart. 1992. Primary human herpesvirus 6 infections in young children. *N. Engl. J. Med.* 326:1445-1450.
- Hall, C.B., C.E. Long, K.C. Schnabel, M.T. Caserta, K.M. McIntyre, M.A. Costanzo, A. Knott, S. Dewhurst, R.A. Insul, and L.G. Epstein. 1994. Human herpesvirus 6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N. Engl. J. Med.* 331:432-438.
- Schmidt, N.J. 1984. Update on class-specific viral antibody assays. *Clin. Immunol. News*. 5: 81-85.
- Krueger, G.R.F., D.V. Ablashi, S.F. Joseph, S.Z. Salahuddin, U. Lembke, A. Ramon, and G. Bertram. 1991. Clinical indications and diagnostic techniques of human herpesvirus-6 (HHV6) infection. *In Vivo*. 5:287-296.

SCIMEDX CORPORATION
b33 Highbayton Rd
Dover, NJ 07801 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8796
www.scimedx.com

EC	REP	Medimark Europe 11, rue Zola – BP 2332 F-38033 Grenoble Cedex 2 - France	CE
----	-----	---	----



ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgM FRENTE AL HERPESVIRUS HUMANO 6 (HHV6)

Sólo para exportación
Para uso diagnóstico *in vitro*.

I-HV601M	120 Tests
I-HV602M	40 Tests
I-HV603M	40 Tests

Uso previsto

El ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA) para la detección de anticuerpos IgM frente al antígeno del herpesvirus humano 6 (HHV6) de SCIMEDX se utiliza para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos IgM (inmunoglobulina M) frente al HHV6 en suero o plasma humano. La detección de anticuerpos IgM frente al HHV6 en seres humanos puede utilizarse como ayuda en el diagnóstico de la infección primaria por este virus.

Introducción y resumen de los procedimientos del ensayo

El herpesvirus humano 6 (HHV6) es un virus humano linfotrópico, aislado por primera vez en individuos inmunosuprimidos y pacientes con trastornos linfoproliferativos. Es un virus con DNA, llamado originalmente virus linfotrópico de células B humanas (HBLV), clasificado actualmente como miembro de la familia de los herpesvirus humanos (1-2). El HHV6 es genética y serológicamente diferente de otros herpesvirus humanos conocidos (2-4). Estudios serológicos que utilizan ensayos de fluorescencia indirecta (IFA) demostraron que la población general presenta frecuentemente anticuerpos contra el virus. La infección primaria por HHV6 suele ocurrir antes de los dos años de edad. Un alto porcentaje de individuos mayores de un año son seropositivos en anticuerpos anti-HHV6 (4-6). La infección primaria en adultos es poco frecuente debido al alto índice de infección en la infancia. La infección primaria en adultos sanos suele provocar una enfermedad leve, pero pueden surgir complicaciones más serias en pacientes inmunocomprometidos o en pacientes sometidos a trasplante de órganos o médula ósea (4). El HHV6 ha sido identificado como agente causal de la roseola infantum, también conocida como **exantema súbito**. El virus se ha aislado en niños con **exantema súbito** y esta asociación es apoyada por sendos estudios serológicos (7-9). La **roseola infantum** se considera una enfermedad infantil benigna no estacional que se manifiesta clínicamente con erupción y fiebre. Los lactantes están protegidos por los anticuerpos maternos, de modo que la infección es más frecuente entre los 6 y los 18 meses de edad. Los datos serológicos son valiosos para el diagnóstico ya que la detección del anticuerpo con la técnica IFA es sensible y específica, sin reacciones cruzadas con otros herpesvirus humanos (3,5,10,11-13).

Principio del ensayo

Los ensayos de anticuerpos fluorescentes de SCIMEDX utilizan el método indirecto de detección de anticuerpos y determinación de la titulación. Las muestras de suero o plasma del paciente se aplican a células de cultivo que contienen antígenos virales inactivados suministrados en pocillos delineados en portaobjetos de vidrio. Durante un período de incubación de 60 minutos, el anticuerpo específico para antígenos HHV6 forma un complejo antígeno/anticuerpo con el antígeno HHV6 de las células infectadas. Los anticuerpos no específicos y otras proteínas de suero sin reaccionar se eliminan mediante un breve lavado. A continuación, se aplica anti-IgM humana de cabra conjugada con fluoresceína, a los pocillos del portaobjetos de vidrio. El conjugado anti-IgM se combina con la IgM humana, si está presente, durante una incubación de 30 minutos. Después de un lavado rápido para eliminar el conjugado no reaccionado, se observan los portaobjetos con microscopía de fluorescencia. Una fluorescencia verde brillante en los sitios de unión del antígeno evidencia una reacción positiva del anticuerpo.

Materiales suministrados y condiciones de almacenamiento

Portaobjetos de antígeno HHV6: Portaobjetos de linfocitos humanos infectados con HHV6 en cada pocillo. Sólo con retirar la bolsa protectora, los portaobjetos están en condiciones de ser utilizados. Almacenar a 2-8 °C. Los portaobjetos son estables en estas condiciones hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa.

Control positivo IgM HHV6: Cada vial contiene 0,5 ml de control humano positivo del anticuerpo IgM HHV6. Este componente es un líquido listo para usar. Almacenar a 2-8 °C. El control positivo líquido es estable en estas condiciones hasta la fecha de caducidad impresa en el vial.

Control negativo IgM HHV6: Cada vial contiene 0,5 ml de control humano negativo del anticuerpo IgM HHV6. Este componente es un líquido listo para usar. Almacenar a 2-8 °C. El control negativo líquido es estable en estas condiciones hasta la fecha de caducidad impresa en el vial.

Conjugado de fluoresceína: Cada vial contiene 1,5 ml de anti-IgM humana de cabra conjugada con fluoresceína (inactivada) (específica de la cadena μ) con azul de Evans y contraindicaciones de rodamina. El conjugado de fluoresceína es una conjugación de anti-IgM humana purificada por cromatografía por afinidad con isotiocianato de fluoresceína (FITC). La contraindicación con azul de Evans y rodamina enmascara la fluorescencia no específica de las células del cultivo tisular. Este componente es un líquido listo para utilizar. Almacenar a 2-8 °C. El conjugado líquido es estable en estas condiciones hasta la fecha de caducidad impresa en el vial.

Medio de montaje del cubreobjetos: Cada vial contiene 2,0 ml de glicerol tamponado con fosfato con retardador de la atenuación. Este componente es un líquido listo para utilizar. La temperatura de almacenamiento puede variar de temperatura fría a temperatura ambiente (2-30 °C). El medio de montaje es estable en cualquier condición de almacenamiento hasta la fecha de caducidad impresa en el vial.

Solución salina tamponada con fosfato (PBS): Cada paquete sellado y aluminizado de tampón en polvo prepara un litro de PBS 1X. Las temperaturas de almacenamiento pueden variar de temperatura fría a temperatura ambiente (2-30 °C). Agregar la totalidad del contenido de un sobre de PBS a un litro de agua desionizada o destilada recién preparada. Nota: La incorporación de las sales mientras se agita rápidamente el agua facilitará la solubilización. Almacenar el PBS en solución a 2-8 °C.

Absorbentes especiales: Los absorbentes tienen orificios premoldeados para utilizar en el secado de la máscara de la lámina. Las temperaturas de almacenamiento pueden variar de temperatura fría a temperatura ambiente (2-30 °C).

Precauciones generales

Kit para IFA: Sin norma de potencia para Estados Unidos.

I-HV601M Printed in U.S.A Rev D 7/9/22

- Almacenar todos los componentes del kit a las temperaturas recomendadas o sugeridas. **No congelar.**
- No utilizar los componentes después de la fecha de caducidad de cada uno.
- SCIMEDX optimiza todos los componentes activos en cada lote de sus kits para IFA como una unidad. No mezclar los componentes de diferentes lotes o diferentes fuentes.
- Los controles y el conjugado contienen 0,095 % de azida sódica, cuya acumulación puede formar componentes explosivos en plomo y/o cobre. Limpie exhaustivamente las tuberías si las hubiera utilizado para desechar estos materiales.
- Use distintas puntas de pipeta para cada una de las muestras y reactivos para evitar la contaminación cruzada.
- Los reactivos deben inspeccionarse en busca de evidencias de contaminación bacteriana o micótica.

Portaobjetos de antígeno: Todos los portaobjetos de antígeno para IFA tienen células fijadas que no contienen ningún agente infeccioso viable. Sin embargo, las buenas prácticas de laboratorio (GLP) exigen cuidado en su manipulación y eliminación, así como en la de cualquier otro material de laboratorio potencialmente biopeligroso.

- No retirar los portaobjetos de sus bolsas protectoras hasta el momento de utilizarlos.
- No reutilizar portaobjetos.

Controles humanos: Los controles humanos de estos kits han sido evaluados para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y el anticuerpo del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) por métodos aprobados por la FDA, habiéndose encontrado no reactivos. Sin embargo, ningún sistema de pruebas puede asegurar la ausencia de estos agentes. Todos los componentes de suero humano, incluso aquellos recibidos en su laboratorio para análisis, deben manipularse como potencialmente biopeligrosos.

☒ Xn-Sustancia nociva

Precauciones de seguridad del control y del conjugado:

La concentración de azida sódica en estos componentes se clasifica como nociva y está sujeta a la siguiente frase de riesgo: "Peligroso si se ingiere; libera un gas muy tóxico en contacto con ácidos."

Componente	CS001 PBS Powder Packets	Consejos de prudencia Prevención: P264 Lavarse ... concienzudamente tras la manipulación. P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Respuesta: P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. P337+P313 Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.
	O-GLB01Y Mounting Medium	
Pictograma		
Palabra Clave	ATENCIÓN	
Indicación de Peligro	H319 Provoca irritación ocular grave.	

Recogida de las muestras, almacenamiento y limitaciones de las muestras analizadas

Separar asepticamente el suero recogido o el plasma y los hematíes, y almacenar en congelación (-10 °C o menos) hasta el momento del ensayo. Evitar congelar y descongelar repetidas veces.

Si así se desea, las muestras de suero líquido o plasma fresco se pueden almacenar a 2-8 °C hasta una semana, sin pérdida de actividad de los anticuerpos.

No utilizar muestras excesivamente lipémicas ni antes deslipidadas.

No utilizar muestras contaminadas.

SCIMEDX recomienda diluciones de análisis de 1:10 y 1:40 para fines de ensayo, a menos que se elimine la IgG interferente mediante un pretratamiento. Si el suero se somete a pretratamiento, será suficiente una dilución de 1:10 para la prueba. Disponemos de un reactivo de pretratamiento. Llamar al Servicio al cliente para obtener más información.

Material adicional necesario

Probetas, gradillas, pipetas, placas de microtitulación y dispositivos de seguridad para pipeteo, para realizar las diluciones de las muestras

Incubador a 37 °C

Cámara húmeda para la incubación de portaobjetos

Gradilla para el soporte de portaobjetos y plato de tinción para el lavado de portaobjetos

Cubreobjetos: 22 X 50 mm, vidrio de grosor nº 1

Microscopio de fluorescencia: Se utilizó un microscopio de fluorescencia para calibrar los controles y el conjugado, equipado con lo siguiente:

- Ocular de 10X
- Objetivos de 16X o 40X
- Epi-iluminador con lámpara halógena de 50 W
- Filtro de excitación de FITC KP490
- Filtro absorbente del amarillo K530
- Filtro de supresión rojo BG38

El marcador de fluoresceína tiene un pico de excitación de 490 nm y un pico de emisión de 520 nm. Las diferencias en las reactividades de punto de referencia y en las intensidades de fluorescencia pueden deberse al tipo y condición del equipo de fluorescencia utilizado en el laboratorio.

Protocolo IFA

1. Para la determinación de anticuerpos IgM, preparar una dilución de análisis de 1:10 y 1:40 de cada muestra en PBS. Preparar todas las diluciones con un volumen mínimo de 0,10 ml, con PBS como diluyente. Para las muestras pretratadas para eliminar la IgG, es suficiente una dilución de 1:10. SCIMEDX dispone de un reactivo de pretratamiento para eliminar la IgG mediante el siguiente procedimiento: Añadir 45 µl del reactivo a 5 µl de muestra y mezclar bien. La dilución a 1:10 resultante puede utilizarse inmediatamente. Puede producirse precipitación, pero ésta no interferirá con los resultados del ensayo IFA.
 2. Extraer los portaobjetos de su bolsa protectora y aplicar 1 gota (aproximadamente 20 µl) de la(s) muestra(s) diluida(s) a cada pocillo. Añadir suficiente volumen para cubrir completamente cada pocillo, pero sin dejar que se mezclen los contenidos de los diferentes pocillos.
- Nota: El proceso de análisis de cada día requiere un pocillo para el control positivo, uno para el control negativo y otro para el PBS (control de conjugado).
3. Incubar los portaobjetos en una cámara húmeda durante 60 minutos a 37 °C.
 4. Aclarar los portaobjetos con un ligero chorro de tampón. Evitar dirigir el chorro hacia los pocillos.
 5. Lavar los portaobjetos durante 10 minutos con PBS, cambiando la solución de PBS después de 5 minutos. Agitar los portaobjetos moviendo la gradilla hacia arriba y hacia abajo en el tampón.
 6. Absorber la máscara de pintura que rodea los pocillos utilizando los absorbentes especiales que se suministran con el kit.
 7. Aplicar a cada pocillo una gota de conjugado listo para su uso.
 8. Incubar los portaobjetos en una cámara húmeda durante 30 minutos a 37 °C.

- Repetir los pasos 4 (aclorado con PBS), 5 (lavado de 10 minutos con PBS), 6 (absorción).
- Aplicar el medio de montaje de glicerol y un cubreobjetos de vidrio de 22 X 50 mm para cubrir los pocillos del portaobjetos.
- Observar la reactividad bajo microscopía de fluorescencia con una ampliación de 20–40X. Para obtener óptimos resultados, examinar los portaobjetos inmediatamente después de terminar el ensayo. Para obtener resultados equivalentes, sellar los portaobjetos o mantenerlos húmedos para minimizar la deshidratación del medio de montaje, almacenarlos en la oscuridad a 2–8 °C, y leerlos a los tres días. La intensidad de fluorescencia de la reactividad positiva puede oscilar de brillante a débil. Evaluar la reacción de fluorescencia según la siguiente escala de intensidad: 4° (muy brillante), 3° (brillante), 2° (moderada), 1° (débil).

Interpretación de los resultados

La tinción fluorescente verde brillante de las células infectadas indica una reacción positiva de anticuerpos IgM frente al HHV6. El patrón de tinción fluorescente de las células infectadas por HHV6 es variable. El patrón de fluorescencia puede variar, desde fluorescencia de una pequeña parte de la célula infectada hasta fluorescencia de la célula completa, dependiendo del estado de infección de la célula. La fluorescencia también puede variar de granular a homogénea. Para proporcionar un control interno, cada pocillo del portaobjetos contiene células infectadas y no infectadas por HHV6. El portaobjetos se prepara de esta forma a propósito. Las células no infectadas, teñidas de rojo por la contratinción, proporcionan una base para contraste. El grado de infección de las células oscila entre el 20 y el 60 %. La titulación de suero IgM HHV6 positivo sólo es necesaria para minimizar los anticuerpos interferentes o para proporcionar información cuantitativa. En una serie de titulación, la dilución de suero más alta que demuestra una reacción 1° se interpreta como el punto de referencia.

La ausencia de tinción fluorescente específica de las células infectadas indica una reacción negativa de anticuerpos IgM frente al HHV6.

Significancia de la interpretación

1. No se ha encontrado fluorescencia discernible de las células infectadas en las diluciones de análisis.	1. La muestra es negativa en anticuerpos IgM frente al HHV6.
2. Se ha encontrado fluorescencia positiva específica de las células infectadas en cualquiera de las diluciones de análisis.	2. La muestra es positiva en anticuerpos IgM frente al HHV6, lo que indica una infección actual.
3. Se ha encontrado fluorescencia tanto en las células infectadas como en las no infectadas.	3. La muestra analizada indica una reacción no específica.

Control de calidad

- Para asegurarse de que el ensayo funciona correctamente, utilizar los controles positivo y negativo al menos una vez en las pruebas de cada día.
- El tipo y antigüedad del microscopio de fluorescencia y las horas de uso de la bombilla UV, pueden afectar hasta cierto punto a la intensidad de la fluorescencia y a los puntos finales de la titulación. El control positivo de anticuerpos frente al HHV6 suministrado con este kit está envasado que indica una reacción de intensidad de 2° a 4°. El vial tiene un título listado que puede utilizarse como comprobación adicional del sistema de ensayo (ver Notificación de dilución 1°). Utilizarlo como calibrador de una reacción de intensidad de 2° a 4° en el microscopio.
- Utilizar el control negativo de anticuerpos frente al HHV6 suministrado con este kit como calibrador de una reacción negativa en el equipo.
- El ensayo de cada día deberá incluir un pocillo de PBS en lugar de una muestra. Este control de conjugado se utiliza para asegurarse de que el conjugado no reacciona con el sustrato celular.

Notificación de dilución 1°

El control positivo suministrado con este kit es un líquido listo para usar y proporciona una intensidad de fluorescencia de 2° a 4° al ser analizado. Para obtener una intensidad de fluorescencia 1°, realice diluciones dobles al título indicado en el vial que se incluye en este kit. Titular el control positivo con el uso inicial de este kit.

El título que obtenga con el ensayo puede diferir del título de punto de referencia listado, debido a varias razones técnicas. Es mejor analizar el título indicado en el vial, así como la dilución doble, inmediatamente antes y después del título listado. Es normal que los resultados obtenidos para un título de punto de referencia (1°) difieran entre laboratorios debido a factores que afectan a la intensidad de fluorescencia. Estos factores son:

- la potencia nominal de la fuente de luz UV del microscopio
- el tipo de fuente de luz
- la antigüedad de la lámpara
- la longitud de la trayectoria óptica del microscopio y los filtros ópticos utilizados
- la precisión de las técnicas de dilución y el equipo de dilución

Limitaciones del protocolo

- Un ensayo serológico como el IFA sirve como ayuda en la detección de infección viral, pero no debe utilizarse como criterio único para el diagnóstico. Los resultados del ensayo se deben combinar con la información proporcionada por el paciente, la evaluación clínica y otros procedimientos de diagnóstico disponibles.
- Las reacciones positivas no específicas, tales como las de anticuerpos antinucleares y/o anticuerpos anticitoplásmicos, pueden producirse en muestras de pacientes con ciertas enfermedades autoinmunes. Tanto las células infectadas como las no infectadas mostrarán fluorescencia, lo cual puede oscurecer una reacción positiva frente al HHV6. Por tanto, la observación de una reacción autoinmune no puede eliminar la posibilidad de una infección por HHV6.
- SCIMEDX recomienda un pretratamiento de las muestras para eliminar los anticuerpos IgG. Este paso adicional ayuda a eliminar los resultados falsos negativos y falsos positivos. Cuando el anticuerpo IgG compete con el anticuerpo IgM en puntos de unión específicos, el anticuerpo IgG puede provocar un resultado falso negativo. Cuando el anticuerpo IgG forma complejos inmunes con el sustrato de antígeno que puede, a su vez, unirse al factor reumatoide (clase IgM), puede provocar un resultado falso positivo.
- Una muestra obtenida demasiado temprano durante la infección puede no contener niveles detectables de anticuerpos IgM. Si se sospecha una infección viral, deberá obtenerse una segunda muestra entre 7 y 14 días más tarde. La segunda muestra debe analizarse simultáneamente con la primera para determinar la seroconversión o un aumento significativo del título de IgM o IgG específicos del virus. Tanto la seroconversión como el aumento significativo del título son indicativos de infección primaria.
- Es prudente analizar una muestra de seguimiento del recién nacido para confirmar los resultados virales positivos para anticuerpo IgM en muestras de sangre del cordón, preferiblemente dentro de los primeros cinco días de vida, debido a la posibilidad de contaminación de la sangre del cordón con IgM materna (14).

- Los anticuerpos IgM específicos suelen detectarse en pacientes con infecciones primarias recientes. Pueden encontrarse anticuerpos IgM en pacientes con infecciones reactivadas o secundarias, o en pacientes sin otras evidencias detectables de infección reciente (15).

Características de funcionamiento

Sensibilidad relativa y especificidad: Se evaluó el kit IFA IgM HHV6 de SCIMEDX contra un método IFA IgM HHV6 disponible en el mercado. El estudio analizó 19 muestras congeladas en un laboratorio clínico comercial. La concordancia general fue de 18/19 o del 94,7 %. Los datos se resumen en la siguiente tabla.

IFA de SCIMEDX

ELISA alternativo	Estado IgM HHV6	Reactivo	No reactivo	Total
	Reactivo	5	0	5
	No reactivo	1	13	14
Total		6	13	19

Reproducibilidad: Cuatro muestras seropositivas con varios títulos (de 1:10 a 1:80) y seis muestras seronegativas se diluyeron en serie y en duplicado, y se analizaron tres veces en tres diferentes ensayos, y se determinó el punto de referencia. Los 30 títulos de punto de referencia estuvieron dentro de las especificaciones de $\pm$ una dilución doble.

Título idéntico	28/30
$\pm$ una dilución doble	2/30

Especificidad: Se analizaron 13 sueros con actividad de anticuerpos frente a enfermedades con una reacción cruzada potencial de IgM frente al HHV6 con este kit IFA. No se observó reactividad cruzada en ninguna de las muestras. Consultar la siguiente tabla.

Datos de reactividad cruzada-IgM anti-HHV6 de SCIMEDX

Tipo de enfermedad	Total de muestras	Resultado positivo
Citomegalovirus	4	0/4
Virus de Epstein-Barr	3	0/3
Virus del herpes simple 1	4	0/4
Virus de la varicela-zoster	2	0/2
Total	13	0/13

Estabilidad en tiempo real: El ensayo de estabilidad en tiempo real de los componentes del kit se llevó a cabo en intervalos de 6 meses durante un mínimo de 24 meses. Se compararon los títulos de punto de referencia de los controles positivo y negativo con los títulos de punto de referencia en el momento de su lanzamiento. Los criterios de aceptación son títulos de punto de referencia dentro de una dilución doble entre ellos. Estos resultados estuvieron dentro de las especificaciones.

Estabilidad en tiempo real

Lote de portaobjetos	Control	Título de punto de referencia al lanzamiento	Título de punto de referencia a los 24 meses
#1	Positivo	1:40	1:20
	Negativo	–	–
#2	Positivo	1:40	1:20
	Negativo	–	–
#3	Positivo	1:40	1:20
	Negativo	–	–

Referencias

- Salahuddin, A.K., D.V. Ablashi, P.D. Markham, S.F. Josephs, S. Sturzenegger, M. Kaplan, G. Halligan, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, B. Kramarsky, and R.C. Gallo. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 234:596-601.
- Josephs, S.F., S.Z. Salahuddin, D.V. Ablashi, F. Schacter, F. Wong-Staal, and R. C. Gallo. 1986. Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science*. 234:601-603.
- Ablashi, D.V., S.F. Josephs, A. Buchbinder, K. Hellman, S. Nakamura, T. Liana, P. Lusso, M. Kaplan, J. Dahlberg, S. Memon, F. Imam, K.L. Ablashi, P.D. Markham, B. Kramarsky, G.R.F. Krueger, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, S.Z. Salahuddin, and R.C. Gallo. 1988. Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus 6). *J. Virol. Methods*. 21:29-48.
- Stewart, J.A. 1990. Human herpesvirus 6: basic biology and clinical associations. *In* L.M. de la Maja and E. M. Peterson (ed.), *Medical virology*, Vol. 9. Plenum Press, New York.
- Linde, A., H. Dahl, B. Wahren, E. Fridell, Z. Salahuddin, and P. Biberfeld. 1988. IgG antibodies to human herpesvirus 6 in children and adults both in primary Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections. *J. Virol. Methods*. 21:117-123.
- Briggs, M., J. Fox, and R.S. Tedder. 1988. Age prevalence of antibody to human herpesvirus 6. *Lancet*. i:396.
- Yamanishi, K., T. Okuno, K. Shiraki, M. Tarahashi, T. Kando, Y. Asano, and T. Kurata. 1988. Identification of human herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. i:1065-1067.
- Takahashi, K., S. Smoda, K. Kawakami, K. Migata, T. Oki, and T. Nagata. 1988. Human herpesvirus 6 and exanthem subitum. *Lancet*. i:1463.
- Ueda, K., K. Kusuura, M. Hirase, K. Okada, C. Migajaki, K. Tokugawa, M. Nakagawa, and K. Yamanishi. 1989. Exanthem subitum and antibody to human herpesvirus 6. *J. Infect. Dis.* 159:750-752.
- Irving, W.L., and A.L. Cunningham. 1990. Serological diagnosis of infection with human herpesvirus type 6. *Br. Med. J.* 300:158-159.
- Linnavuori, K., H. Peltola, and T. Hovi. 1992. Serology versus clinical signs or symptoms and main laboratory findings in the diagnosis of exanthem subitum (roseola infantum). *Pediatrics*. 89:103-106.
- Pincus, A.N., P. C.B. Hall, R.A. Insul, K. McIntyre, P.E. Pellett, C.E. Long, K.C. Schnabel, P.H. Krueger, F.R. Stamey, T.R. Dambaugh, and J.A. Stewart. 1992. Primary human herpesvirus 6 infections in young children. *N. Engl. J. Med.* 326:1445-1450.
- Hall, C.B., C.E. Long, K.C. Schnabel, M.T. Caserta, K.M. McIntyre, M.A. Costanzo, A. Knott, S. Dewhurst, R.A. Insul, and L.G. Epstein. 1994. Human herpesvirus 6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N. Engl. J. Med.* 331:432-438.
- Schmidt, N.J. 1984. Update on class-specific viral antibody assays. *Clin. Immunol. News*. 5: 81-85.
- Krueger, G.R.F., D.V. Ablashi, S.F. Joseph, S.Z. Salahuddin, U. Lemke, A. Ramon, and G. Bertram. 1991. Clinical indications and diagnostic techniques of human herpesvirus-6 (HHV6) infection. *In Vivo*. 5:287.

SCIMEDX CORPORATION
53 Hitchbottom Rd
Dover, NJ 07801 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8796
www.scimedx.com

EC	REP	Medimark Europe 11, rue Zola – BP 2332 F-38033 Grenoble Cedex 2 - France
----	-----	---





ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA INDIRECTA PARA O ANTICORPO IgM DO HERPESVIRUS 6 (HHV6)

Somente para exportação

Somente para utilização em diagnóstico *in vitro*.

I-HV601M	120 Tests
I-HV602M	40 Tests
I-HV603M	40 Tests

Utilização

O Ensaio de Fluorescência Indirecta (IFA) da SCIMEDX para o Anticorpo IgM do Herpesvírus Humano 6 (HHV6) destina-se à detecção qualitativa e semi-quantitativa do anticorpo IgM (Imunoglobulina M) para o HHV6 no soro ou plasma humanos. A detecção do anticorpo IgM do HHV6 em seres humanos contribui para o diagnóstico da infecção primária por este vírus.

Introdução e resumo dos procedimentos do teste

O herpesvírus humano 6 (HHV6) é um vírus linfotrófico humano, isolado pela primeira vez em indivíduos imunossuprimidos e doentes com doença linfoproliferativa. Trata-se de um vírus ADN, originalmente designado de vírus linfotrófico da célula B humana (HBLV), agora classificado como membro da família dos herpesvírus (1-2).

O HHV6 é geneticamente e serologicamente distinto de outros herpesvírus humanos conhecidos (2-4). Estudos serológicos, utilizando o ensaio de fluorescência indirecta (IFA), demonstraram que o anticorpo do vírus é comum na população geral. A infecção primária com HHV6 ocorre, normalmente, antes dos dois anos de idade. Uma elevada percentagem de seres humanos com mais de um ano de idade são seropositivos para o anticorpo anti-HHV6 (4-6). A infecção primária em adultos é rara devido à elevada percentagem de infecção durante a infância. Embora uma infecção primária em adultos saudáveis resulte, normalmente, em doença ligeira, podem surgir complicações mais graves em doentes imunocomprometidos ou doentes submetidos a transplante de órgãos ou medula óssea (4). O HHV6 foi identificado como o agente responsável da roseola infantum, também conhecida por exantema súbito. O vírus foi isolado em crianças com exantema súbito e a associação reforçada por estudos serológicos (7-9).

A roseola infantum é considerada uma doença benigna não sazonal da infância com indicações clínicas do tipo erupção cutânea e febre. Os bebés estão protegidos pelos anticorpos da mãe pelo que a infecção é mais frequente entre os 6 e os 18 meses de idade. A informação serológica é de grande validade no diagnóstico, uma vez que a detecção do anticorpo através da técnica IFA é sensível e específica, sem reactividade cruzada com outros herpesvírus humanos (3,5,10,11-13).

Princípio do teste

Os ensaios de anticorpo fluorescente da SCIMEDX utilizam o método indirecto de detecção de anticorpos e determinação de títulos. As amostras com soro ou plasma dos doentes são aplicadas em culturas de células que contêm antígenos virais inactivados, fornecidos em poços delineados por tinta em lâminas de microscópio de vidro. Durante um período de incubação de 60 minutos, o anticorpo específico para os antígenos do HHV6 forma um complexo antígeno/anticorpo com os antígenos do HHV6 nas células infectadas. Num breve passo de lavagem, os anticorpos não específicos e outras proteínas de soro sem reacção são eliminados. É depois aplicada anti-IgM humana de caprino conjugada a fluoresceína nos poços da lâmina de vidro. O conjugado anti-IgM combina com o IgM humano, se existente, durante uma incubação de 30 minutos. Após uma breve lavagem para remover conjugado sem reacção, as lâminas são analisadas por microscopia de fluorescência. Verifica-se uma reacção de anticorpos positivos, através da fluorescência verde brilhante, nos locais do antígeno.

Materiais fornecidos e condições de armazenamento

Lâminas do antígeno do HHV6: lâminas de linfócitos humanos infectados com HHV6 em cada poço de vidro. As lâminas estão prontas a utilizar, depois de removidas da bolsa de protecção. Armazenar a 2-8 °C. As lâminas mantêm-se estáveis nesta condição de armazenamento até à data de validade indicada no rótulo da bolsa.

Controlo positivo IgM do HHV6: cada frasco contém 0,5 ml de controlo humano positivo para anticorpos IgM do HHV6. Este componente é um líquido pronto a utilizar. Armazenar a 2-8 °C. O controlo positivo líquido mantém-se estável nesta condição de armazenamento até à data de validade indicada no rótulo do frasco.

Controlo negativo IgM do HHV6: cada frasco contém 0,5 ml de controlo humano negativo para anticorpos IgM do HHV6. Este componente é um líquido pronto a utilizar. Armazenar a 2-8 °C. O controlo negativo líquido mantém-se estável nesta condição de armazenamento até à data de validade indicada no rótulo do frasco.

Conjugado a fluoresceína: cada frasco contém 1,5 ml anti-IgM humana (inactivada) de caprinos conjugada a fluoresceína (cadeia específica μ) com os contracócorantes azul de Evans e Rhodamine. O conjugado de fluoresceína é uma conjugação de anti-IgM humana de cromatografia de afinidade purificada com isotiocianato de fluoresceína (FITC). O facto de se acrescentarem os contracócorantes azul de Evans e Rhodamine ao conjugado disfarça a fluorescência não específica das células em culturas de tecidos. Este componente é um líquido pronto a utilizar. Armazenar a 2-8 °C. O conjugado líquido mantém-se estável nesta condição de armazenamento até à data de validade indicada no rótulo do frasco.

Meio de montagem de lamela: cada frasco contém 2,0 ml de tampão fosfato com glicerol com retardador de desvanecimento. Este componente é um líquido pronto a utilizar. A temperatura de armazenamento poderá variar entre refrigerado e temperatura ambiente (2-30 °C). O meio de montagem mantém-se estável em qualquer condição de armazenamento até à data de validade indicada no rótulo do frasco.

Solução tampão salina de fosfato (PBS): cada embalagem selada em alumínio de tampão em pó compõe um litro de 1X PBS. As temperaturas de armazenamento poderão variar entre refrigerado e temperatura ambiente (2-30 °C). Adicionar todo o conteúdo da embalagem de PBS a um litro de água destilada ou desionizada acabada de preparar. Nota: a adição de sais enquanto a água é mexida com vigor facilitará a solubilização. Guardar a PBS como solução a 2-8 °C.

Mata-borrões especiais: os mata-borrões absorventes possuem orifícios pré-cortados para secagem da máscara da lâmina. As temperaturas de armazenamento poderão variar entre refrigerado e temperatura ambiente (2-30 °C).

Precauções gerais

Kit do teste do IFA: *No US Standard of Potency.*

- Guardar todos os componentes do kit às temperaturas sugeridas ou recomendadas. Não congelar.

- Não utilizar os componentes para além da data de validade indicada de cada componente.
- A SCIMEDX otimiza todos os componentes activos em cada lote de kits IFA como uma unidade. Não misturar componentes de lotes ou origens diferentes.
- Os controlos e conjugado contêm 0,095 % de azida sódica que, em caso de acumulação, pode produzir compostos explosivos em tubagens de chumbo ou cobre. Caso seja utilizado, fazer correr bastante água no sistema de esgotos, para eliminar estes materiais.
- Use as pontas de pipeta separada para cada amostra e reagente para evitar a contaminação cruzada.
- Os reagentes devem ser inspecionados quanto à evidência de contaminação bacteriana ou fúngica.

Lâminas do antígeno: todas as lâminas de antígeno do IFA possuem células fixas que não contêm quaisquer agentes infecciosos viáveis. No entanto, as boas práticas laboratoriais (BPL) requerem um manuseamento e uma eliminação cuidadosos das lâminas, tal como para qualquer outro material de laboratório que apresente risco biológico.

- Não remover as lâminas da respectiva bolsa de protecção até estar preparado para efectuar o teste.
- Não reutilize slides

Controlos humanos: os controlos humanos existentes nestes kits foram todos testados quanto ao antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e ao anticorpo do vírus da imunodeficiência humana (HIV) mediante métodos aprovados pela FDA, tendo sido considerados não reactivos. No entanto, nenhum sistema de teste pode assegurar a ausência destes agentes. Manusear todos os componentes de soro humano, incluindo os entregues no laboratório para a realização de testes, como material com potencial risco biológico.

Xn – Substância perigosa
Medidas de precaução e segurança do controlo e conjugado:

a concentração de azida sódica nestes componentes é classificada como perigosa e sujeita à seguinte frase de risco: "Nocivo em caso de ingestão e em contacto com ácidos liberta gás altamente tóxico".

Componente	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Recomendação de prudência Prevenção: P264 Lavar ... cuidadosamente após manuseamento. P280 Usar luvas de protecção/roupa de protecção/oculoprotecção facial. Resposta: P305+P351+P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. P337+P313 Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.
Pictograma		
Signal Word	AVISO	
Advertência de Perigo	H319 Provoca irritação ocular grave.	

Colheita de amostras, armazenamento e limitações das amostras para teste

Separar soro ou plasma colhidos assepticamente a partir de glóbulos vermelhos e guardar congelado (-10 °C ou menos) até à altura do teste. Evitar a congelação e descongelação repetidas.

Quando pretendido, guardar amostras de soro ou plasma líquidas recém colhidas entre 2° e 8 °C durante até uma semana, sem perda da actividade dos anticorpos.

Não utilizar amostras excessivamente lipémicas sem proceder à remoção de lípidos.

Não utilizar amostras contaminadas.

A SCIMEDX recomenda diluições de rastreio nas proporções de 1:10 e 1:40 para testes, a menos que um passo de pré-tratamento elimine o IgG interferente. Se o soro for sujeito a pré-tratamento, o teste com uma diluição na proporção de 1:10 será suficiente. Temos disponível um reagente de pré-tratamento. Contactar a assistência ao cliente para mais informações.

Materiais adicionais necessários

Tubos de ensaio, suportes, pipetas, placas de microelisa e dispositivos de pipetagem de segurança para a produção de diluições de amostra.

Incubador a 37 °C.

Uma câmara de humidade para a incubação de lâminas.

Suporte de lâminas e placa de coloração para a lavagem de lâminas.

Lamelas: vidro de 22 X 50 mm de espessura n.º 1.

Microscópio de fluorescência: foi utilizado um microscópio de fluorescência equipado com os itens a seguir indicados, para calibrar os controlos e o conjugado.

- * Óculo 10X
- * Objectivas 16X ou 40X
- * Epi-iluminador com lâmpada de halógeno de 50 W
- * FITC-filtro de excitação fluorescente KP490
- * Filtro amarelo absorvente K530
- * Filtro vermelho de supressão BG38

O rótulo de fluoresceína possui um pico de excitação de 490 nm e um pico de emissão de 520 nm. As diferenças nas reactividades finais e intensidades de fluorescência poderão dever-se ao tipo e condição do equipamento de fluorescência utilizado no laboratório.

Procedimento IFA

1. Para a determinação de anticorpos IgM, preparar uma diluição de rastreio na proporção de 1:10 e 1:40 de cada amostra de teste em PBS. Preparar todas as diluições num volume mínimo de 0,10 ml com o PBS como diluente. Para amostras pré-tratadas para remover o IgG, uma diluição na proporção de 1:10 é suficiente. A SCIMEDX pode disponibilizar um reagente de pré-tratamento para remover o IgG através do seguinte procedimento: adicionar 45 µl de reagente a 5 µl de amostra de teste e misturar bem. A diluição na proporção de 1:10 resultante pode ser imediatamente utilizada. Poderá ocorrer precipitação, mas não irá interferir nos resultados do teste IFA.
2. Remover as lâminas da bolsa de protecção e aplicar 1 gota (cerca de 20 µl) de amostra(s) diluída(s) em cada poço. Acrescentar volume suficiente para cobrir completamente cada poço, embora não deva ocorrer a mistura cruzada de conteúdos entre os poços.

Nota: cada série de testes do dia requer um poço para o controlo positivo, um para o controlo negativo e um para o PBS (controlo de conjugado).

3. Incubar as lâminas numa câmara de humidade durante 60 minutos a 37 °C.
4. Lavar as lâminas num fluxo ligeiro de tampão. Evitar dirigir o fluxo para os poços.
5. Lavar as lâminas durante 10 minutos em PBS, mudando a solução PBS após 5 minutos. Agitar as lâminas, deslocando o suporte para cima e para baixo no tampão.
6. Absorver a máscara de tinta que circunda os poços de teste com os mata-borrões especiais fornecidos no kit.

- Aplicar uma gota do conjugado pronto a utilizar em cada poço de teste.
- Incubar as lâminas numa câmara de humidade durante 30 minutos a 37 °C.
- Repetir os passos 4 (lavagem com PBS), 5 (lavagem com PBS durante 10 minutos) e 6 (absorção).
- Aplicar meio de montagem com glicerol e lamelas de vidro de 22 x 50 mm para cobrir os poços da lâmina.
- Observar a reactividade sob microscopia de fluorescência utilizando uma ampliação de 20–40X. Para melhores resultados, examinar as lâminas imediatamente após a conclusão do teste. Para obter resultados equivalentes, vedar as lâminas ou mantê-las húmidas para minimizar a secagem do meio de montagem, armazenar no escuro a 2–8 °C e interpretar no prazo de três dias. A reactividade positiva poderá variar em intensidade de fluorescência entre brilhante a fraca. Classificar a reacção de fluorescência de acordo com a seguinte escala de intensidade: 4⁺ (brilhante), 3⁺ (viva), 2⁺ (moderada), 1⁺ (fraca).

Interpretação dos resultados

A coloração com fluorescência verde viva das células infectadas apresenta uma reacção positiva de anticorpos IgM do HHV6. O padrão de coloração com fluorescência das células infectadas com HHV6 é variável. Dependendo da fase de infecção das células, o padrão de fluorescência poderá variar entre uma pequena porção da célula infectada até à totalidade da mesma. A fluorescência poderá também variar entre granular a homogénea. Para possibilitar um controlo interno, cada poço da lâmina de microscópio contém células infectadas por HHV6 e não infectadas. A preparação da lâmina desta forma é intencional. As células não infectadas, coloridas de vermelho pelo contracolorante, oferecem um fundo contrastante. A infectividade das células varia entre 20 % e 60 %. Não é necessária a titulação do soro IgM positivo para o HHV6, salvo para minimizar os anticorpos interferentes ou para facultar informações quantitativas. Numa série de titulações, a diluição de soro mais elevada apresentando uma reacção 1+ é interpretada como a titulação final. A ausência de coloração específica por fluorescência das células infectadas revela uma reacção negativa dos anticorpos IgM do HHV6.

Significado da interpretação

1. Ausência de fluorescência diferenciável das células infectadas detectadas nas diluições de rastreio.	1. A amostra de teste é negativa para o anticorpo do IgM do HHV6.
2. Fluorescência positiva específica das células infectadas detectadas em qualquer diluição de rastreio.	2. A amostra de teste é positiva para o anticorpo IgM do HHV6, indicando infecção actual.
3. Fluorescência detectada nas células infectadas e não infectadas.	3. A amostra de teste apresenta uma reacção não específica.

Controlo de qualidade

- Para assegurar a funcionalidade adequada do teste, utilizar os controlos positivo e negativo pelo menos uma vez para cada dia de testes.
- O tipo e a caducidade do microscópio de fluorescência e as horas de utilização da lâmpada de UV podem afectar a intensidade da fluorescência e as titulações finais até certo ponto. O controlo positivo para o anticorpo HHV6 é fornecido com este kit em frascos, que apresenta uma reacção de intensidade entre 2⁺ e 4⁺. O frasco inclui um título indicado que deve ser utilizado como verificação adicional no sistema de teste (consultar nota relativa à diluição 1⁺). Utilizar isto como calibrador para uma reacção de intensidade 2⁺ a 4⁺ no microscópio.
- Utilizar o controlo negativo para o anticorpo do HHV6, fornecido com este kit, como calibrador para uma reacção negativa no equipamento.
- O teste do dia deverá incluir um poço de PBS em substituição da amostra de teste. Trata-se de um controlo de conjugado para assegurar a não reacção do conjugado com o substrato de células.

Nota relativa à diluição 1⁺

O controlo positivo deste kit é um líquido pronto a utilizar para oferecer uma intensidade de fluorescência de 2⁺ e 4⁺ quando testado. Para obter uma intensidade de fluorescência de 1⁺, providenciar diluições duplas com o título indicado no frasco fornecido com este kit. Titular o controlo positivo com a utilização inicial do kit. O título obtido nos testes poderá diferir do título final indicado, devido a várias razões técnicas. É conveniente testar o título indicado no frasco, assim como as diluições duplas imediatamente antes de avançar e seguindo o título indicado. É normal que os resultados obtidos para um título final (1⁺) difiram entre laboratórios, devido a factores que afectam a intensidade da fluorescência. Estes factores incluem:

- a potência nominal da fonte de luz UV no microscópio;
- o tipo de fonte de luz;
- a caducidade da lâmpada;
- o comprimento do percurso óptico do microscópio e tipos de filtros ópticos utilizados;
- a precisão das técnicas de diluição e o equipamento de diluição.

Limitações do procedimento

- Um teste serológico, tal como o IFA, contribui para a detecção da infecção vírica, mas a sua utilização não deverá ser o único critério. Os resultados do teste devem ser utilizados conjuntamente com as informações disponibilizadas pelo doente, a avaliação clínica e outros procedimentos de diagnóstico disponíveis.
- Podem ocorrer reacções positivas não específicas, tais como reacções de anticorpos antinucleares e/ou anticorpos anticitoplásmicos, em amostras de doentes com determinadas doenças autoimunes. As células infectadas e não infectadas ficarão fluorescentes, o que poderá obscurecer uma reacção HHV6 positiva. Por isso, a observação de uma reacção autoimune não pode excluir a possibilidade de infecção por HHV6.
- A SCIMEDX recomenda o pré-tratamento das amostras de teste para remoção do anticorpo IgG. O passo adicional ajuda a eliminar resultados falsos negativos e falsos positivos. Quando o anticorpo IgG compete com o anticorpo IgM por locais de fixação específicos, o anticorpo IgG poderá dar origem a um resultado falso negativo. Sempre que o anticorpo IgG forma complexos imunes com o substrato antigénico que poderá fixar o factor reumatóide (classe IgM), poderá dar origem a um resultado falso positivo.
- Uma amostra colhida demasiado cedo durante a infecção poderá não conter níveis detectáveis de anticorpo IgM. Em caso de suspeita de infecção viral, deverá obter-se uma segunda amostra, 7 a 14 dias depois. A segunda amostra deverá ser testada concomitantemente com a primeira, no sentido de ser detectada a seroconversão ou um aumento significativo do título de IgM ou IgG específicos de vírus. A seroconversão ou o aumento significativo do título constituem factores indicativos de infecção primária.
- Devido à possibilidade de contaminação do sangue do cordão umbilical com IgM da mãe, é aconselhável confirmar os resultados a anticorpos IgM virais positivos em amostras de sangue do cordão umbilical, através do teste a uma amostra colhida ao recém-nascido, de preferência nos primeiros cinco dias de vida (14).

- Normalmente, são detectados anticorpos IgM específicos em doentes com infecção primária recente. Podem ser encontrados anticorpos IgM em doentes com infecções reactivadas ou secundárias, ou em doentes sem qualquer outro indicio detectável de infecção recente (15).

Características de desempenho

Sensibilidade e especificidade relativas: o kit IFA de IgM do HHV6 da SCIMEDX foi avaliado em comparação com um ELISA-IgM de HHV6 disponível no mercado. Foram testadas dezanove amostras congeladas num estudo realizado num laboratório clínico comercial. A concordância geral foi de 18/19 ou 94,7 %. A tabela abaixo resume os dados.

IFA da SCIMEDX				
ELISA alternativo	Estado IgM do HHV6	Reactivo	Não reactivo	Total
	Reactivo	5	0	5
	Não reactivo	1	13	14
	Total	6	13	19

Reprodutibilidade: quatro soros seropositivos com vários títulos (1:10 a 1:80) e seis soros seronegativos foram duplamente diluídos em série e, cada um analisado três vezes em três ensaios diferentes, sendo o título final determinado. Todos os trinta títulos finais encontravam-se dentro das especificações de $\pm$ uma diluição dupla.

Título idêntico	28/30
$\pm$ uma diluição dupla	2/30

Especificidade: foram testados treze soros com actividade de anticorpos a doenças com o potencial para a reactividade cruzada ao IgM do HHV6 neste kit IFA. Não se verificou qualquer reactividade cruzada para qualquer uma das amostras. Consultar a tabela que se segue.

Dados da reactividade cruzada — IFA de IgM do HHV6 da SCIMEDX		
Tipo de Doença	Total de Amostras	Resultado Positivo
Citomegalovírus	4	0/4
Vírus Epstein-Barr	3	0/3
Vírus Herpes Simplex tipo 1	4	0/4
Vírus Varicela-zoster	2	0/2
Total	13	0/13

Estabilidade em tempo real: os testes à estabilidade em tempo real dos componentes do kit foram realizados em intervalos de 6 meses, durante um período mínimo de 24 meses. O título final dos controlos positivo e negativo foram comparados aos títulos finais aquando da libertação. Os critérios de aceitação são os títulos finais numa diluição dupla de cada. Estes resultados encontram-se dentro das especificações.

Estabilidade em tempo real			
Lote de lâminas	Controlo	Título final na libertação	Título final em 24 meses
n.º 1	Positivo	1:40	1:20
	Negativo	—	—
n.º 2	Positivo	1:40	1:20
	Negativo	—	—
n.º 3	Positivo	1:40	1:20
	Negativo	—	—

Literatura consultada

- Salahuddin, A.K., D.V. Ablashi, P.D. Markham, S.F. Josephs, S. Sturzenegger, M. Kaplan, G. Halligan, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, B. Kramarsky, and R.C. Gallo. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 234:596-601.
- Josephs, S.F., S.Z. Salahuddin, D.V. Ablashi, F. Schacter, F. Wong-Staal, and R. C. Gallo. 1986. Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science*. 234:601-603.
- Ablashi, D.V., S.F. Josephs, A. Buchbinder, K. Hellman, S. Nakamura, T. Liana, P. Lusso, M. Kaplan, J. Dahlberg, S. Memon, F. Imam, K.L. Ablashi, P.D. Markham, B. Kramarsky, G.R.F. Krueger, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, S.Z. Salahuddin, and R.C. Gallo. 1988. Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus 6). *J. Virol. Methods*. 21:29-48.
- Stewart, J.A. 1990. Human herpesvirus 6: basic biology and clinical associations. *In* L.M. de la Maja and E. M. Peterson (ed.), *Medical virology*, Vol. 9. Plenum Press, New York.
- Linde, A., H. Dahl, B. Wahren, E. Fridell, Z. Salahuddin, and P. Biberfeld. 1988. IgG antibodies to human herpesvirus 6 in children and adults both in primary Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections. *J. Virol. Methods*. 21:117-123.
- Briggs, M., J. Fox, and R.S. Tedder. 1988. Age prevalence of antibody to human herpesvirus 6. *Lancet*. i:396.
- Yamanishi, K., T. Okuno, K. Shiraki, M. Tarahashi, T. Kando, Y. Asano, and T. Kurata. 1988. Identification of human herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. i:1065-1067.
- Takahishi, K., S. Smoda, K. Kawakami, K. Migata, T. Oki, and T. Nagata. 1988. Human herpesvirus 6 and exanthem subitum. *Lancet*. i:1463.
- Ueda, K., K. Kusuhara, M. Hirase, K. Okada, C. Migajaki, K. Tokugawa, M. Nakagawa, and K. Yamanishi. 1989. Exanthem subitum and antibody to human herpesvirus 6. *J. Infect. Dis.* 159:750-752.
- Irving, W.L., and A.L. Cunningham. 1990. Serological diagnosis of infection with human herpesvirus type 6. *Br. Med. J.* 300:158-159.
- Linnavuri, K., H. Peltola, and T. Hovi. 1992. Serology versus clinical signs or symptoms and main laboratory findings in the diagnosis of exanthem subitum (roseola infantum). *Pediatrics*. 89:103-106.
- Pruksananonda, P., C.B. Hall, R.A. Insul, K. McIntyre, P.E. Pellett, C.E. Long, K.C. Schnabel, P.H. Pincus, F.R. Stamey, T.R. Dambaugh, and J.A. Stewart. 1992. Primary human herpesvirus 6 infections in young children. *N. Engl. J. Med.* 326:1445-1450.
- Hall, C.B., C.E. Long, K.C. Schnabel, M.T. Caserta, K.M. McIntyre, M.A. Costanzo, A. Knott, S. Dewhurst, R.A. Insul, and L.G. Epstein. 1994. Human herpesvirus 6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N. Engl. J. Med.* 331:432-438.
- Schmidt, N.J. 1984. Update on class-specific viral antibody assays. *Clin. Immunol. Newsl.* 5: 81-85.
- Krueger, G.R.F., D.V. Ablashi, S.F. Joseph, S.Z. Salahuddin, U. Lemke, A. Ramon, and G. Bertram. 1991. Clinical indications and diagnostic techniques of human herpesvirus-6 (HHV6) infection. *In Vivo*. 5:287-296.

SCIMEDX CORPORATION

b33 Hightbynton Hd

Dover, NJ 07801 USA

Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822

Fax: 973.625.8796

www.scimedx.com

EC	REP	Medimark Europe 11, rue Zola – BP 2332 F-38033 Grenoble Cedex 2 - France	CE
----	-----	---	----

NEPŘÍMÉ FLUORESCENČNÍ STANOVENÍ PROTILÁTEK IgM PROTI LIDSKÉMU HERPESVIRU 6 (HHV6)

POUZE PRO EXPORT

I-HV601M	120 testů
I-HV602M	40 testů
I-HV603M	40 testů

Účel použití

SCIMEDX Indirect Fluorescence Assay (IFA) na protilátky IgM proti lidskému Herpesviru 6 (HHV6) je určen pro kvalitativní a semikvantitativní detekci IgM (Immunoglobulin M) protilátek proti HHV6 v lidském séru nebo plazmě. Detekci protilátek HHV6 IgM u člověka lze použít jako pomůcku při diagnostice primární infekce tímto virem.

Úvod a shrnutí postupu testu

Lidský Herpesvirus 6 (HHV6) je lidský lymfotropní virus, poprvé izolovaný u imunosuprimovaných jedinců a pacientů s lymfoproliferativními poruchami. Jde o DNA virus, původně nazývaný lidský B-lymfotropní virus (HBLV), nyní klasifikovaný jako člen rodu lidských herpesvirů (1-2). HHV6 je geneticky a sérologicky odlišný od dalších známých lidských herpesvirů (2-4). Sérologické studie, používající nepřímé fluorescenční stanovení (IFA), ukázaly, že jsou protilátky proti tomuto viru v obecné populaci běžné. Primární infekce HHV6 se obvykle objeví před druhým rokem věku. Vysoké procento lidí nad jeden rok věku je séropozitivní na protilátky anti-HHV6 (4-6). Primární infekce u dospělých je vzácná z důvodu vysokého výskytu infekce v dětství. Zatímco vede primární infekce u zdravých dospělých obvykle ke slabému onemocnění, vážnější komplikace mohou nastat u imunokomprimovaných pacientů nebo pacientů s transplantací orgánů nebo kostní dřeně (4). HHV6 byl identifikován jako původce roseola infantum, také známé jako exanthem subitum. Tento virus byl izolován u dětí s exanthem subitum a spojení s ním bylo dále podpořeno sérologickými studiemi (7-9). Roseola infantum je považováno za benigní nesezónní onemocnění dětí s klinickými příznaky vyrážky a horečky. Kojení jsou chráněny mateřskými protilátky, takže je infekce nejčastější mezi 6. a 18. měsícem věku. Sérologická informace je pro diagnostiku cenná, jelikož je detekce protilátek pomocí techniky IFA senzitivní a specifická, bez zkřížené reakce s jinými lidskými herpesviry (3, 5, 10, 11-13).

Princip testu

Fluorescenční stanovení protilátek SCIMEDX používá nepřímou metodu detekce protilátek a stanovení titru. Pacientské sérum nebo plazma se aplikuje na kultivované buňky obsahující inaktivované virové antigeny nanesené v jamkách sklička pro mikroskopii. Během 60 minutové inkubace vytvoří protilátky specifické pro HHV6 antigeny komplex antigen/protilátka s antigeny HHV6 v infikovaných buňkách. Krátkým promytím se odstraní nespecifické protilátky a ostatní nezreagované proteiny séra. Pak se do jamek na skličku aplikuje fluoresceinem-konjugované kozi protilidské IgM. Anti-IgM konjugát se spojí s lidským IgM, pokud je přítomno, během 30 minutové inkubace. Po krátkém promytí na odstranění nezreagovaného konjugátu se sklička prohlédne ve fluorescenčním mikroskopu. Pozitivní reakce protilátek je označena jako světlé zelená fluorescence na místech antigenů.

Dodané materiály a podmínky uchovávání

HHV6 antigenová sklička: Sklička s lidskými lymfocyty infikovanými HHV6 v každé jamce sklička. Sklička jsou připravena k použití po odstranění ochranné fólie. Uchovávejte při 2-8°C. Sklička jsou stabilní za těchto podmínek uchovávání do data expirace na obalu.

HHV6 IgM Pozitivní kontrola: každá lahvička obsahuje 0.5 ml pozitivní lidské kontroly na lidské protilátky HHV6 IgM. Tato složka je tekutina k přímému použití. Uchovávejte při 2-8°C. Tekutá pozitivní kontrola je stabilní za těchto podmínek uchovávání do data expirace uvedeného na štítku lahvičky.

HHV6 IgM Negativní kontrola: Každá lahvička obsahuje 0.5 ml negativní kontroly na lidské protilátky HHV6 IgM. Tato složka je tekutina připravená k použití. Uchovávejte při 2-8°C. Tekutá negativní kontrola je stabilní za těchto podmínek uchovávání do data expirace uvedeného na štítku lahvičky.

Fluoresceinový konjugát: Každá lahvička obsahuje 1.5 ml fluoresceinem konjugovaných kozích (inaktivovaných) protilidských IgM (specifický y řetězec) s Evansovou modří a Rhodaminem jako barvivy. Konjugát fluoresceinu je konjugace afinitní chromatografi purifikovaného protilidského IgM s fluorescein izothiokyanátem (FITC). Přidání Evansovy modře a Rhodaminu maskuje nespecifickou fluorescenci tkáňové kultury buněk. Tato tekutá složka je připravena k použití. Uchovávejte při 2-8°C. Tekutý konjugát je stabilní za těchto podmínek do data expirace na štítku.

Montovací médium na krycí skličko: Každá lahvička obsahuje 2.0 ml fosfátového pufru glycerolu se zpomalovačem blednutí. Tato složka je tekutina k přímému použití. Rozmezí teploty uchování je od chladu až po pokojovou teplotu (2-30°C). Montovací médium je stabilní za těchto podmínek uchování do data expirace na štítku.

Fosfátový pufr (PBS): Každý aluminiový obal obsahuje prášek na přípravu 1litru 1X PBS. Teplota uchování se může lišit od chladu až po pokojovou teplotu (2-30°C). Celý obsah sáčku PBS dejte do 1 litru čerstvé připravené destilované nebo deionizované vody.

Pozn.: Přidávání soli do vody za rychlého míchání usnadní rozpouštění. PBS uchovávejte jako roztok při 2-8°C.

Speciální blotery: Absorbční blotery mají předem připravené děrování pro použití na vysušení masky sklička. Teplota uchování může být od chladu až po pokojovou teplotu (2-30°C).

Obecné pokyny

IFA Test Kit: Nemá standard účinnosti v USA.

- Všechny složky kitu uchovávejte za doporučených teplot. **Nezmrazujte.**
- Nepoužívejte jednotlivé složky po uvedeném datu expirace.
- SCIMEDX optimalizuje všechny aktivní komponenty v každé šarži kitů IFA jako celek. Nemíchejte komponenty z různých šarží nebo z různých zdrojů.
- Kontroly a konjugát obsahuje 0.095% azidu sodného, který, pokud se akumuluje, může tvořit expozivní komponenty s olovem a/nebo mědí. Pokud likvidujete tento materiál, dobře proplachujte odpad.
- Použijte vždy novou pipetovací špičku pro každý vzorek a reagentii, aby se zabránilo zkřížené kontaminaci.
- Reagencie je třeba sledovat na přítomnost kontaminace bakteriemi nebo plísněmi.

Antigenová sklička: Všechna IFA antigenní sklička mají fixované buňky, které neobsahují žádné životaschopné infekční agens. Nicméně, správná laboratorní praxe (GLP) vyžaduje

opatrné nakládání se skličky a jejich likvidaci jako u ostatního potenciálně biologicky nebezpečného laboratorního materiálu.

- Až do použití nevydávajte sklička z jejich ochranného obalu.
- Substrátové skličko znovu nepoužívejte.

Lidské kontroly: lidské kontroly v těchto kitech byly všechny testovány na HbsAg (hepatitis B surface antigen) a protilátky proti HIV pomocí FDA schválených metod a byly shledány nereaktivní. Nicméně, žádný testovací systém nemůže zajistit absenci těchto agens. Považujte všechny komponenty z lidského séra, včetně vzorků na testování, za potenciálně biologicky nebezpečné.

Xn-látka škodlivá

Bezpečnostní upozornění - Kontrola a Konjugát:

Konzentrace azidu sodného v těchto komponentách je klasifikovaná jako škodlivá a odpovídá následující rizikové větě: "Škodlivé při požití a při kontaktu s kyselinami uvolňuje velmi toxické plyny."

Komponenta	CS001 PBS prášek O-GLB01Y Montovací médium	P- věty Prevence: P264 Po práci si dobře omyjte ruce. P280 Používejte ochranné rukavice a oděv. Náprava: P305+P351+P338 PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Proplachujte několik minut pod tekoucí vodou. Vyměňte kontaktní čočky, pokud je máte a jde to snadno. Pokračujte v proplachování. H- věta H319 Způsobuje vážné podráždění očí
Piktogram		
Signální slovo	VAROVÁNÍ	
		P337+P313 Pokud pětřvává podráždění, vyhledejte lékařskou pomoc.

Odběr vzorku, uchovávání a omezení testování vzorků

- Separujte asepticky odebrané sérum nebo plazmu od červených krvinek a uložte ho zmrazené (-10°C nebo níže) až do testování. Vyvarujte se opakovanému zmrazení a rozmrazení.
- Pokud je třeba, uložte čerstvé tekuté vzorky séra nebo plazmy při 2° až 8°C až jeden týden bez ztráty aktivity protilátek.
- Nepoužívejte velmi lipemické vzorky bez delipidizace.
- Nepoužívejte kontaminované vzorky.
- SCIMEDX doporučuje pro testovací účely screeningová ředění 1:10 a 1:40, pokud krok předošetření neodstraní interferující IgG. Pokud je sérum předem ošetřeno, je testování při zředění 1:10 dostatečné. Předošetřovací reagentie je od nás k dispozici. Pro další informace prosím volejte zákaznický servis.

Další nutné materiály

- Testovací zkumavky, držáčky, pipety, mikrotitrační destičky a bezpečné pipetovače pro provádění ředění vzorků
- 37°C inkubátor
- Vlhká komůrka pro inkubaci skliček
- Držák skliček a barvicí miska pro promývání skliček
- Krycí sklička: 22 X 50 mm tenká sklička č. 1

Fluorescenční mikroskop: Fluorescenční mikroskop pro kalibraci kontrol a konjugátů, vybavený takto:

- 10X okulár
- 16X nebo 40X objektivy
- Epiluminátor s 50W halogenovou lampou
- FITC-excitační filtr KP490
- Žlutý absorbční filtr K530
- Červený supresní filtr BG38

Fluorescein má excitační pik 490 nm a emisní pik 520 nm. Diference v endpoint reaktivitě a intenzitě fluorescence mohou záviset na typu a kondici fluorescenčního vybavení použitého ve vaší laboratoři.

Postup IFA

- Pro kvalitativní stanovení IgM protilátek připravte screeningové ředění 1:10 a 1:40 každého testovaného vzorku v PBS. Všechna ředění připravte v minimálním objemu 0.10 ml s PBS jako ředidlem. Pro předošetření vzorků na odstranění IgG je dostatečné ředění 1:10. SCIMEDX může dodat reagentii na předošetření na odstranění IgG následujícím způsobem: Dejte 45 µl reagentie k 5 µl testovaného vzorku a dobře promíchejte. Výsledkem je ředění 1:10, které může být ihned použito. Mohou se objevit precipitáty, ale nebudou interferovat výsledky IFA testu.
- Vydejte sklička z obalu a aplikujte 1 kapku (asi 20 µl) naředěného testovaného vzorku (vzorků) do každé jamky. Přidejte dostatečný objem pro úplné pokrytí každé jamky, ale zabraňte vzájemnému smíchání obsahu jamek.
Pozn.: Každý den vyžaduje běh vždy jednu jamku na pozitivní kontrolu, negativní kontrolu a PBS (kontrolu konjugátu).
- Inkubujte sklička ve vlhké komůrce po 60 minut při 37°C.
- Omyjte sklička v lehkém proudu pufru. Nemíchejte proud přímo do jamek.
- Promývejte sklička po 10 minut se změnou roztoku PBS po 5 minutách. Třeptejte sklička pohybem držáčku nahoru a dolů v pufru.
- Blotujte okolí testovacích jamek speciálními blotery dodanými v kitu.
- Aplikujte jednu kapku konjugátu k přímému použití do každé testovací jamky.
- Inkubujte sklička ve vlhké komůrce po 30 minut při 37°C.
- Opakujte kroky 4 (inkubace), 5 (PBS promytí 10 min) a 6 (blotování).
- Aplikujte glycerolové montovací médium a krycí skličko 22 X 50 mm na překrytí jamek na skličku.
- Pozorujte reaktivitu pod fluorescenčním mikroskopem pomocí zvětšení 20-40X. Pro nejlepší výsledek stanovte sklička ihned po dokončení testu. Pro získání odpovídajících výsledků ukládejte sklička uzavřená nebo za vlhka, aby se minimalizovala dehydratace montovacího média, uložte je ve tmě při 2-8°C, a odečítejte během třech dnů. Pozitivní reaktivita může mít intenzitu fluorescence od brilantní po slabou. Odstupňujte reakci fluorescence podle následující škály intenzity: 4+ (brilantní), 3+ (jasná), 2+ (střední) a 1+ (slabá).

Interpretace výsledků

- Jasně zelené fluorescenční zbarvení infikovaných buněk znamená pozitivní reakci HHV6 IgM protilátek. Patern fluorescenčního barvení HHV6 infikovaných buněk je variabilní.
- V závislosti na stavu infekce buňky se může fluorescenční patern lišit od malých fluoreskujících částí infikované buňky až po fluorescenci celé buňky. Fluorescence také může být od granulované po homogenní. Jako interní kontrolu obsahuje každá jamka mikroskopického sklička jak HHV6 infikované, tak neinfikované buňky. Příprava sklička tímto způsobem je záměrná. Neinfikované buňky, obarvené barvivem červené,

poskytují kontrast pozadí. Infektivita buněk leží v rozmezí 20-60%. Titrace pozitivního séra HHV6 IgM není nezbytná, vyjma na minimalizaci interferujících protilátek nebo na poskytnutí kvantitativní informace. V titračních sériích je nejvyšší zředění séra demonstrující reakci 1⁺ interpretováno jako endpoint.

- Absence specifického fluorescenčního barvení infikovaných buněk znamená negativní reakci pro HHV6 IgM protilátky.

Význam pro interpretaci

4. Není rozlišitelná fluorescence infikovaných buněk při screeningovém ředění.	4. Testovaný vzorek je negativní na HHV6 IgM protilátky.
5. Specifická pozitivní fluorescence infikovaných buněk nalezená u některého screeningového ředění.	5. Testovaný vzorek je pozitivní na HHV6 IgM, což indikuje současnou infekci.
6. Fluorescence se nachází jak u infikovaných, tak u neinfikovaných buněk.	6. Testovaný vzorek vykazuje nespecifickou reakci.

Kontrola kvality

- Na ověření, zda test proběhl správně, použijte pozitivní a negativní kontroly nejméně jednou pro každý den testování.
- Typ a stáří fluorescenčního mikroskopu a hodiny použití UV lampy mohou ovlivnit určitým způsobem intenzitu fluorescence a endpoint titrace. Pozitivní kontrola na protilátky HHV6, zabudovaná v kitu, demonstruje intenzitu reakce 2⁺ až 4⁺. Lahvička má uvedený titer pro použití a další ověřování testovacího systému (viz 1⁺ Poznámky k ředění). Použijte ji jako kalibrátor pro reakci intenzity 2⁺ až 4⁺ u vašeho mikroskopu.
- Použijte negativní kontrolu na protilátky HHV6 obsaženou v tomto kitu jako kalibrátor pro negativní reakci na vašem přístroji.
- Test v každém dnu musí obsahovat jednu jamku PBS jako testovaný vzorek. Jde o kontrolu konjugátu na ověření, že nereaguje konjugát s buněčným substrátem.

1⁺ Poznámka k ředění

Pozitivní kontrola v tomto kitu je připravena k použití a při testování dává intenzitu fluorescence 2⁺ až 4⁺. Pro získání intenzity fluorescence 1⁺ udělejte dvojnásobné ředění k titru uvedenému na lahvičce v kitu. Titrujte pozitivní kontrolu s původním použitím v kitu. Titr, který získáte v testování, se může lišit od uvedeného ředění z důvodu mnoha technických důvodů. Nejlepší je testovat titer uvedený na lahvičce a také dvojnásobné ředění těsně předcházející a následující pro uvedeném titru. Je normální u výsledků získaných pro endpoint (1⁺) titer, že se liší mezi laboratořemi kvůli faktorům ovlivňujícím intenzitu fluorescence. Tyto faktory zahrnují:

- hodnoty zdroje UV lampy v mikroskopu
- druh světelného zdroje
- stáří lampy
- délka optické cesty mikroskopu a typy použitých optických filtrů
- presnost techniky ředění a použité pomůcky na ředění

Omezení procedury

- Sérologický test jako je IFA slouží jako pomůcka při detekci virové infekce, ale jeho použití není jediným kritériem. Výsledky testu je třeba použít ve spojení s dostupnou informací od pacienta, klinickým obrazem a dalšími dostupnými diagnostickými postupy.
- Nespecifické pozitivní reakce, jako jsou reakce antinukleárních protilátek a/nebo anticytoplazmatických protilátek, se mohou objevit u vzorků od pacientů s určitými autoimunitními chorobami. Budou fluoreskovat jak infikované, tak neinfikované buňky, a to může udělat nezřetelnou pozitivní reakci HHV6. Tudiž nemůže zjištění autoimunitní reakce eliminovat možnost infekce HHV6.
- SCIMEDX doporučuje předsoušetření testovaných vzorků na odstranění IgG protilátek. Tento krok navíc umožňuje eliminovat falešně negativní a falešně pozitivní výsledky. Pokud IgG protilátky soupeří s protilátkami IFA o specifická vazebná místa, mohou protilátky IgG zúsobit falešně negativní výsledek. Pokud IgG protilátky tvoří imunokomplexy s antigenickým substrátem, který pak může navázat revmatoidní faktor (IgM třída), mohou IgG protilátky způsobit falešně pozitivní výsledek.
- Vzorek získaný moc brzy během infekce, nemusí obsahovat detekovatelné hladiny IgM protilátek. Pokud je podezření na virovou infekci, je třeba získat druhý vzorek, o 7-14 dní později. Druhý vzorek je třeba testovat souběžně s prvním vzorkem na zjištění sérokonverze nebo významného zvýšení titru virové specifického IgM nebo IgG. Bud sérokonverze nebo výrazné zvýšení titru je indikací primární infekce.
- Vzhledem k možnosti kontaminace pupečňikové krve matematickým IgM je vhodné konfirmovat pozitivní výsledek na virové IgM protilátky na vzorcích pupečňikové krve testováním následných vzorků novorozence, nejlépe během prvních pěti dnů života (14).
- Specifické IgM protilátky jsou obvykle detekovány u pacientů s nedávnou primární infekcí. IgM protilátky se mohou nacházet u pacientů s reaktivovanou nebo sekundární infekcí nebo u pacientů bez jiných detekovatelných důkazů nedávné infekce (15).

Charakteristiky provedení

Relativní senzitivita a specifita: Test SCIMEDX HHV6 IgM IFA kit byl hodnocen proti komerčně dostupné HHV6 IgM ELISA. Studie testovala devatenáct zmrazených vzorků v komerční klinické laboratoři. Celková shoda byla 18/19 nebo 94.7%. Tabulka níže shrnuje data.

SCIMEDX IFA				
Alternativní ELISA	HHV6 IgM Status	Reaktivní	Nereaktivní	Celkem
	Reaktivní	5	0	5
	Nereaktivní	1	13	14
	Celkem	6	13	19

Reprodukovatelnost: Čtyři séropozitivní séra s různými titry (1:10 až 1:80) a šest séronegativních sér bylo sérově zředěno dvakrát a stanoveno třikrát na třech různých stanoveních a byl dán endpoint. Všechny třicet endpoint titrů bylo v rozmezí specifikací ± jedno dvojnásobné ředění.

Identický titer	28/30
± jedno dvojnásobné ředění	2/30

Specifita: Třináct sér s protilátkovou aktivitou na onemocnění, která mají potenciál pro zkříženou reaktivitu s HHV6 IgM, bylo testováno na tomto kitu IFA. Nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita pro některé ze vzorků. Viz tabulka níže.

Data zkřížené reaktivity -SCIMEDX HHV6 IgM IFA

Typ onemocnění	Celkem vzorků	Pozitivní výsledek
Cytomegalovirus	4	0/4
Epstein-Barr virus	3	0/3
Herpes Simplex Virus 1	4	0/4
Varicella Zoster Virus	2	0/2
Celkem	13	0/13

Real Time stabilita: Testování komponent kitu na real time stabilitu bylo provedeno v 6 měsíčních intervalech po minimálně 24 měsících. Endpoint titer pozitivních a negativních kontrol byl srovnán s počátečními endpoint titry. Akceptační kritéria byly endpoint titry v rozmezí jednoho dvojnásobného ředění od každého. Tyto výsledky ležely uvnitř specifikací.

Real Time stabilita

Sarže sklička	Kontrola	Endpoint titer úvodní	Endpoint titer po 24 měsících
#1	Pozitivní	1:40	1:20
	Negativní	–	–
#2	Pozitivní	1:40	1:20
	Negativní	–	–
#3	Pozitivní	1:40	1:20
	Negativní	–	–

Citovaná literatura

- Salahuddin, A.K., D.V. Ablashi, P.D. Markham, S.F. Josephs, S. Sturzenegger, M. Kaplan, G. Halligan, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, B. Kramarsky, and R.C. Gallo. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. **234**:596-601.
- Josephs, S.F., S.Z. Salahuddin, D.V. Ablashi, F. Schacter, F. Wong-Staal, and R. C. Gallo. 1986. Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science*. **234**:601-603.
- Ablashi, D.V., S.F. Josephs, A. Buchbinder, K. Hellman, S. Nakamura, T. Liang, P. Lusso, M. Kaplan, J. Dahlberg, S. Memon, F. Imam, K.L. Ablashi, P.D. Markham, B. Kramarsky, G.R.F. Krueger, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, S.Z. Salahuddin, and R.C. Gallo. 1988. Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus 6). *J. Virol. Methods*. **21**:29-48.
- Stewart, J.A. 1990. Human herpesvirus 6: basic biology and clinical associations. *In* L.M. de la Maja and E. M. Peterson (ed.), *Medical virology*, Vol. 9. Plenum Press, New York.
- Linde, A., H. Dahl, B. Wahren, E. Fridell, Z. Salahuddin, and P. Biberfeld. 1988. IgG antibodies to human herpesvirus 6 in children and adults both in primary Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections. *J. Virol. Methods*. **21**:117-123.
- Briggs, M., J. Fox, and R.S. Tedder. 1988. Age prevalence of antibody to human herpesvirus 6. *Lancet*. **i**:396.
- Yamanishi, K., T. Okuno, K. Shiraki, M. Tarahashi, T. Kando, Y. Asano, and T. Kurata. 1988. Identification of human herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. **i**:1065-1067.
- Takahishi, K., S. Smoda, K. Kawakami, K. Migata, T. Oki, and T. Nagata. 1988. Human herpesvirus 6 and exanthem subitum. *Lancet*. **i**:1463.
- Ueda, K., K. Kusuhara, M. Hirase, K. Okada, C. Migajaki, K. Tokugawa, M. Nakagawa, and K. Yamanishi. 1989. Exanthem subitum and antibody to human herpesvirus 6. *J. Infect. Dis.* **159**:750-752.
- Irving, W.L., and A.L. Cunningham. 1990. Serological diagnosis of infection with human herpesvirus type 6. *Br. Med. J.* **300**:158-159.
- Linnavouri, K., H. Peltola, and T. Hovi. 1992. Serology versus clinical signs or symptoms and main laboratory findings in the diagnosis of exanthem subitum (roseola infantum). *Pediatrics*. **89**:103-106.
- Pruksananonda, P., C.B. Hall, R.A. Insul, K. McIntyre, P.E. Pellett, C.E. Long, K.C. Schnabel, P.H. Pincus, F.R. Stamey, T.R. Dambaugh, and J.A. Stewart. 1992. Primary human herpesvirus 6 infections in young children. *N. Engl. J. Med.* **326**:1445-1450.
- Hall, C.B., C.E. Long, K.C. Schnabel, M.T. Caserta, K.M. McIntyre, M.A. Costanzo, A. Knott, S. Dewhurst, R.A. Insul, and L.G. Epstein. 1994. Human herpesvirus 6 infection in children. A. prospective study of complications and reactivation. *N. Engl. J. Med.* **331**:432-438.
- Schmidt, N.J. 1984. Update on class-specific viral antibody assays. *Clin. Immunol. Newsl.* **5**: 81-85.
- Krueger, G.R.F., D.V. Ablashi, S.F. Joseph, S.Z. Salahuddin, U. Lembke, A. Ramon, and G. Bertram. 1991. Clinical indications and diagnostic techniques of human herpesvirus-6 (HHV6) infection. *In Vivo*. **5**:287-296.

SCIMEDX CORPORATION
53 Hinchboynton Rd
Dover, NJ 07801 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8796
www.scimedx.com

EC	REP	Medimark Europe 11, rue Zola – BP 2332 F-38033 Grenoble Cedex 2 - France	CE
----	-----	---	----

REF	Catalog number Numero di catalogo Número de Catálogo Numéro de catalogue Katalognummer Katalogové číslo
LOT	Lot Lotto Lote Lot Charge Číslo šarže
EC REP	EC Authorized Representative Rappresentante Autorizzato CE Representante Autorizado CE CE Représentant autorisé EG autorisierter Bevollmächtigter Autorizovaný zástupce EC
CE	EC Declaration of Conformity Dichiarazione di Conformità CE Declaración de Conformidad CE CE Déclaration de Conformité EG Konformitätserklärung CE Prohlášení shody
Σ	Number of tests Numero di test Número de determinaciones Nombre de tests Anzahl der Teste Počet testů
i	See instructions for use Vedere le istruzioni per l'uso Consultar la instrucciones de uso Voir instructions Gebrauchsanweisung beachten Viz návod na použití
⏰	Expiration date Data di scadenza Caducidad Date d'Expiration Haltbarkeitsdatum Datum expirace
+2°C +8°C	Store at 2-8 C / 35-46 F Conservare a 2-8°C/35-46 F Almacenar a 2-8°C / 35-46°F Conserver à 2-8°C Bei 2-8°C / 35-46°F lagern Uchovujte při 2-8 C / 35-46 F
!	Caution Attenzione Precaución Précautions Achtung Pozor
X	Xn-Harmful Substance. Refer to Material Safety Data Sheet Substance nocive (Xn). Voir la fiche sur la sécurité des équipements. Xn – gefährlicher Stoff Siehe Sicherheitsdatenblatt. Xn-Sostanza nociva. Fare riferimento alla Scheda di sicurezza. Xn - Sustancia dañina. Consultar la Hoja de Datos de Seguridad del Material. Xn – Škodlivá substance. Viz bezpečnostní list.
☠	Potential biological risk Potenziale rischio biologico Riesgo potencial biológico Biohazard Potentielle biologische Gefährdung Potenciální biologické riziko
RFU	Ready for use Pronto all'uso Listo para su uso Prêt à l'emploi Gebrauchsfertig K použití přímo

IVD	For in vitro diagnostic use Per uso diagnostico <i>in vitro</i> Para uso solo in vitro Usage in vitro Für in-vitro diagnostische Verwendung Pro použití jako in vitro diagnostikum
RUO	For research use only Solo per ricerca Para uso solo en investigación Pour recherche Nur für Forschungszwecke Pouze pro výzkum
IUO	For investigational use only Solo per uso investigativo Para uso solo en investigación Pour investigation Nur für Forschungszwecke Pouze pro účely hodnocení
PBS	Phosphate Buffered Saline Tampone salino fosfato Fosfato Salino Tamponado Tampon phosphate salin PBS Fosfátový pufr
MS	Mounting Solution, Buffered Glycerol Solution de montage, glycérol tamponné Eindeckmittel, gepuffertes Glycerol Soluzione di montaggio, glicerolo tamponato Solución de montaje, glicerol tamponado Montovací médium, pufrovaný glycerol
AG SLD	Antigen Slide Lames d'antigène Antigen-Objektträger: Vetrino dell'antigene Portaobjetos de antígeno Antigenové sklíčko
FITC	Anti-Human Conjugate with counterstain Conjugué anti-humain avec coloration de contraste Antihuman-Konjugat mit Gegenfärbung Coniugato anti-umano con colorante di contrasto Conjugado anti-humano con contratinción Protididský konjugát s barvivem
NEG	Negative Control Controllo Negativo Control Negativo Contrôle negative Negative Kontrolle Negativní kontrola
POS	Positive Control Controllo Positivo Control Positivo Contrôle positif Positive Kontrolle Pozitivní kontrola
CONJ CNS	Counterstain Colorante di contrasto Contraste Contrecolorant Gegenfärbung Kontrastní látka
CS	Coverslip Coprioggetto Cubre portaobjetos Lamelles couvre-objet Deckgläshen Krycí sklíčko
BLT	Blotters Buvards Löschpapier Tamponi di carta assorbente Absorbentes Blotery
DIL	Sample Diluent Diluente del campione Diluyente de muestra Tampon de dilution Probenverdünnungslösung Redidlo na vzorek