



INDIRECT FLUORESCENCE ASSAY FOR HUMAN HERPESVIRUS 8 (HHV8 LYTIC) IgG ANTIBODY

EXPORT ONLY

I-HV802G 120 Tests
I-HV804G 40 Tests

Intended Use

The SCIMEDX Indirect Fluorescence Assay (IFA) for Human Herpesvirus 8 Antigen (HHV8) Lytic IgG Antibody is intended for the qualitative and semi-quantitative detection of IgG (Immunoglobulin G) antibody to HHV8 lytic antigens in human serum or plasma. Detection of HHV8 IgG antibody in humans can be used as an aid in the diagnosis of primary infection or reactivation/reinfection with this virus, or can provide evidence of previous HHV8 infection.

Introduction and Summary of Test Procedures

Human herpesvirus 8 (HHV8), also known as Kaposi's Sarcoma Herpesvirus (KSHV), was identified in 1994 by Chang from KS lesions. Unique DNA sequences that closely resembled regions of the Herpesvirus saimiri and Epstein-Barr virus were discovered that exist in all forms of Kaposi's sarcoma worldwide, whether the KS is associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection or not. Classical KS is a rare malignancy occurring in elderly Mediterranean men. In patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), KS is the most frequent neoplasm. KS has also been observed in transplant recipients and in certain African populations. In addition, HHV8 has also been associated with body cavity lymphomas, also called primary effusion lymphomas, multi-centric Castlemann's disease, non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma (1-6).

HHV8 is now classified as a gamma herpesvirus, in the genus Rhadinovirus, and resembles EBV in its tropism for B cells and ability to exist in a latent state. Although cell cultures established from body cavity lymphomas are often co-infected with HHV8 and EBV, some of the cultures are EBV negative. If the cell cultures are latently infected with HHV8, they can be chemically induced to produce actively replicating virus. Therefore, these HHV8, non-EBV infected lines, have made serological studies possible to detect antibodies to different viral proteins, including latent antigens, especially latency-associated nuclear antigens (LANA), and lytic antigens expressed by replicating virus (7-8).

Serological studies have shown that infection with HHV8 precedes the tumor development of clinical KS. Studies suggest that HHV8 is sexually transmitted and also indicate that HHV8 viral infection is not as common in the general population as the other herpesviruses. Different serological tests have shown varying prevalence rates for HHV8 antibodies in the normal adult population, from as low as 4% to 25%. More accurate determinations of prevalence rates remain to be established, with the use of a combination of tests measuring antibodies to both lytic and latent antigens and standardization of test systems. When both lytic and latent antibody tests are utilized, nearly all of KS patients and ~90% of HIV infected homosexual men show antibodies to HHV8 (9-14).

Among serological assays, the IFA has been shown to be a practical and accurate serological method for detection and semi-quantitation of IgG antibodies to HHV8. Because of the necessity for detection of antibodies to both lytic and latent antigens, SCIMEDX has two indirect fluorescence assays for determination of HHV8 antibodies, with two kinds of slides for differential detection of antibodies to lytic and latent antigens.

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 30 minute incubation, antibody specific for HHV8 antigens forms an antigen/antibody complex with the HHV8 antigens in the infected cells. In a brief washing step, nonspecific antibody and other unreacted serum proteins are eliminated. Fluorescein-conjugated goat anti-human IgG is then applied to the wells of the glass slide. The anti-IgG conjugate combines with human IgG, 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

HHV8 Antigen Slides: Slides of human lymphocytes expressing HHV8 lytic antigens 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.

HHV8 IgG Positive Control: Each vial contains 0.5 ml HHV8 IgG 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.

HHV8 IgG Negative Control: Each vial contains 0.5 ml HHV8 IgG 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 IgG (heavy and light chain) with Evans Blue and Rhodamine counterstains. The fluorescein conjugate is a conjugation of affinity chromatography purified anti human IgG 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.
- Paired serum samples to demonstrate seroconversion or significant titer increase should be collected 7-14 days apart, stored, then tested simultaneously.

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 qualitative IgG antibody determination, prepare a 1:64 screening dilution of each test sample in PBS. Prepare all dilutions in a minimum volume of 0.10 ml with PBS as the diluent.
2. For quantitative titration of sera, prepare two-fold serial dilutions of the serum sample in PBS, starting with a 1:64 dilution, and adding equal volumes of diluted serum or plasma and PBS for each consecutive dilution.
3. Remove slides from protective pouch and apply 1 drop (approximately 20 µl) 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).
4. Incubate the slides in a moist chamber for 30 minutes at 37°C.
5. Rinse the slides in a light stream of buffer. Avoid directing the stream at the wells.
6. Wash the slides for 10 minutes with a change of PBS solution after 5 minutes. Agitate the slides by moving the rack up and down in the buffer.
7. Blot the paint mask surrounding the test wells with the special blotters.
8. Apply one drop of the ready to use conjugate to each test well.
9. Repeat steps 4 (incubation), 5 (PBS rinse), 6 (10 minute PBS wash), and 7 (blot).
10. Apply the glycerol mounting media and 22 X 50 mm glass coverslip.
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 a HHV8 IgG antibody positive reaction. For lytic antigen, the whole cell, both cytoplasm and nucleus, will fluoresce. To provide an internal control, each well on the microscope slide contains both HHV8 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 15-50%. Titration of positive HHV8 IgG sera will 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 a negative reaction for HHV8 IgG antibody.

Significance of Interpretation

1. No discernible fluorescence of the infected cells found at the screening dilution.	1. Test sample is HHV8 IgG antibody negative.
2. Specific positive fluorescence of the infected cells found at the screening dilution or at higher dilutions.	2. Test sample is HHV8 IgG antibody positive, indicating previous HHV8 infection. Seroreversion or a four-fold or greater rise in IgG antibody titer in paired serum samples indicates recent infection with HHV8.
3. Fluorescence found in both infected and uninfected cells.	3. Test sample is exhibiting a nonspecific reaction.

Note: Performance of a HHV8 IgM antibody specific test aids in the diagnosis of a current HHV8 infection.

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 HHV8 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 1st Dilution Notice). Use this as the calibrator for a 2⁺ to 4⁺ intensity reaction on your microscope.
- Use the HHV8 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.

1st 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 dilution 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.
- A single positive result for HHV8 IgG antibody is significant only in that it indicates previous contact or infection with the virus. For epidemiological purposes a single result is useful. It should not be used, however, as an indication of current or recent infection with the virus. To determine current or recent infection, simultaneous testing of paired specimens of plasma or serum taken 7-14 days apart should be done. A four-fold or greater rise in titer between the first and second sample is indicative of a current or recent infection.
- 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 HHV8 reaction. Therefore, observation of an autoimmune reaction cannot eliminate the possibility of HHV8 infection. Comparison with the positive control, with its particular reaction, or the testing of the sample with a test specific for ANA could be helpful to eliminate false positives.

Expected Values

When both lytic and latent antibody tests are utilized, nearly all of KS patients and ~90% of HIV infected homosexual men show antibodies to HHV8. Different serological tests, including the IFA, ELISA, and immunoblot assays, have shown varying prevalence rates for HHV8 antibodies in the normal adult population – from as low as 4% to 25%. Because of the different sensitivity and specificity of the various immunoassays, further testing with standardization of detection systems will be required to clarify prevalence rates. Seropositivity is not common before puberty.

Performance Characteristics

Relative Sensitivity and Specificity: This kit was compared with an HHV8 ORF 65 ELISA kit to determine the sensitivity and specificity between the two tests. The study tested 311 human serum samples that consisted of samples from patients with Kaposi's sarcoma, Human Herpes Virus 6 and multiple myelomas. Sera from normal blood donors were also included. The data is summarized in the following table.

SCIMEDX IFA					
Alternate ELISA	Samples	HHV8 Lytic Status	Reactive	Non-reactive	Total
	Kaposi's Sarcoma	Reactive	102	0	102
		Non-reactive	0	0	
	Blood Donors	Reactive	0	1	194
		Non-reactive	5	188	
	Multiple Myelomas	Reactive	0	0	10
		Non-reactive	0	10	
	HHV6 Positive	Reactive	0	0	5
		Non-reactive	0	5	
	Total		107	204	311

Serological Agreement: =305/311 = 98.1%

Reproducibility: Six seropositive samples with various titers (1:64 to 1:2048) and one seronegative sample were serially two-fold diluted and assayed three times each on two different days and the endpoint determined. All twenty-one endpoint titers were within specification of plus or minus one two-fold dilution.

Identical titer 18/21
± one, two-fold dilution 3/21

HHV8 Specificity: The IFA test for HHV8 Lytic is a specific test for detecting antibodies to HHV8. Thirty-one of thirty-five sera positive for IgG antibody to either cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), human herpes virus 1 (HSV1), human herpes virus 6 (HHV6), or varicella zoster virus (VZV), or any combination of these viruses, tested negative for HHV8 IgG antibody with this IFA test. The table below summarizes the data.

Cross Reactivity Data-SCIMEDX HHV8 IgG		
Disease Type	Total Samples	Positive Result
CMV	6	3/6

EBV	21	0/21
HSV1	1	0/1
HHV6	6	1/6
VZV	1	0/1
Total	35	4/35

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 titers of the positive and negative controls were 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. Refer to the following table.

Real Time Stability				
Slide Lot	Control	Endpoint Release	Titer at	Endpoint Titer at 24 months
#1	Positive	1:512		1:256
	Negative	–		–
#2	Positive	1:512		1:512
	Negative	–		–
#3	Positive	1:512		1:256
	Negative	–		–

Literature Cited

- Chang, Y., E. Cesarman, M.S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D.M. Knowles, and P.S. Moore. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **265**: 1865-1869.
- Levy, J.A. 1997. Three new human herpesviruses (HHV6, 7 and 8). *Lancet* **349**: 558-562.
- Beral, V. 1996. Epidemiology of Kaposi's sarcoma, in *Cancer Surveys*, vol. 10: Cancer, HIV, and AIDS (Beral, V., Jaffe, H.W., Weiss, R., eds) pp5-22. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Ganem, D. 1996. Human herpesvirus 8 and the biology of Kaposi's sarcoma. *Virology* **7**: 325-332.
- Luppi, M., and G. Torelli. 1996. The new lymphotropic herpesviruses (HHV-6, HHV-7, HHV8) and Hepatitis C Virus (HCV) in human lymphoproliferative diseases: an overview. *Haematologica* **81**: 265-281.
- Kim, S., S.H. Kang, J. Moon, M.S. Kim, Y.S. Kim, K. Park. 1998. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* **30**: 3165.
- Miller, G. M. Rigsby, L. Heston, E. Grogan, R. Sun, C. Metroka, J. Levy, S.-J. Gao, Y. Chang, P. Moore. 1995. Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *New Engl J Med* **334**: 1291-1297.
- Lenette, E.T., D.J. Blackbourn, and J.A. Levy. 1996. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* **348**: 858866.
- Blackbourn, D.J., J. Ambrozak, E. Lenette, M. Adams, B. Ramachandran, and J.A. Levy. 1997. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor. *Lancet* **349**: 609-611.
- Simpson, G.R., T.F. Schultz, D. Whitby, P.M. Cook, C. Boshoff, L. Rainbow, M.R. Howard, S.Gao, R.A. Bozhentky, P. Simmonds, C. Lee, A. de Ruiter, A. Hatzakis, R.S. Tedder, I.V.D. Weller, R.A. Weiss, and P.S. Moore. 1996. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* **349**: 1133-38.
- Kedes, D.H., D. Ganem, N. Ameli, P. Baccetti, and R. Greenblatt. 1997. The prevalence of serum antibody to human herpesvirus 8 (Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus) among HIV-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. *JAMA* **277**: 478-481.
- Kedes, D.H., E. Operskalski, M. Busch, K. Kohn, J. Flood, D. Ganem. 1996. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Med.* **2**: 918-921.
- Martin, J.N., D.Ee. Ganem, D.H. Osmond, K.A. Page-Shafer, D. Macrae, and D.H. Kedes. 1998. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *New Engl. J Med.* **338**: 948-54.
- Chatlynne, L.G., W. Lapps, M. Handy, Y.Q. Huang, R. Masood, A.S. Hamilton, J.W. Said, H.P. Koeffler, M.H. Kaplan, A. Friedman-Kien, P.S. Gill, J.E. Whitman, and D.V. Ablashi. 1998. Detection and titration of human herpesvirus-8 specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* **92**: 53-58.

SCIMEDX CORPORATION
53 Hichbynton 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
----	-----	--





ESSAI BIOLOGIQUE DE FLOUORESCENCE INDIRECT SPECIFIQUE A L'ANTICORPS IgG ANTI-HUMAN HERPESVIRUS 8 (HHV8 Lytique)

Destiné à l'exportation uniquement

Réservé au diagnostic *in vitro*.

I-HV802G	120 Tests
I-HV804G	40 Tests

Utilisation prévue

L'essai par fluorescence indirecte (IFA) de SCIMEDX Corp. pour l'anticorps anti-IgG de l'antigène du virus de l'herpès humain 8 (HHV8 lytique) est conçu pour la détection qualitative et semi quantitative de l'anticorps anti-IgG (Immunoglobuline G) du HHV8 dans le sérum ou le plasma humains. La détection de l'anticorps anti-IgG du HHV8 chez l'homme peut être utilisée pour faciliter le diagnostic de primo-infection ou de réactivation/réinfection par ce virus.

Présentation et résumé des procédures de test

L'herpèsvirus humain de type 8 (HHV-8), également appelé herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi, a été identifié en 1994 par Chang à partir de lésions du SK. Des séquences d'ADN uniques ressemblant étroitement à des régions de l'herpèsvirus saimiri et du virus d'Epstein-Barr ont été découvertes, et elles existent dans toutes les formes du sarcome de Kaposi à travers le monde, que le SK soit associé ou non à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le SK classique est une malignité rare survenant chez les hommes âgés d'origine méditerranéenne. Chez les patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), le SK est le néoplasme le plus fréquent. Le SK a également été observé chez les bénéficiaires de greffes et dans certaines populations africaines. De plus, le HHV-8 a également été associé aux lymphomes des cavités corporelles, également appelés lymphomes des séreuses, à la maladie de Castleman multicentrique, aux lymphomes non hodgkiniens et au myélome multiple (1-6).

L'herpèsvirus humain de type 8 est maintenant classé comme un herpèsvirus gamma, dans le genre Rhadinovirus, et ressemble au virus d'Epstein-Barr de par son tropisme pour les cellules B et sa capacité d'exister à l'état latent. Bien que les cultures cellulaires établies à partir de lymphomes des cavités corporelles soient souvent co-infectées par l'herpèsvirus humain de type 8 et le virus d'Epstein-Barr, certaines cultures sont négatives au virus d'Epstein-Barr. Si les cultures cellulaires sont infectées de manière latente par l'HHV-8, elles peuvent être induites chimiquement à produire une réplication virale active. Par conséquent, ces lignées infectées par l'HHV-8, mais pas par le virus d'Epstein-Barr, ont rendu possible des épreuves sérologiques pour détecter des anticorps contre différentes protéines virales, y compris les antigènes latents, en particulier les antigènes nucléaires associés à la latence (LANA) et les antigènes lytiques exprimés par la réplication virale (7-8).

Des études sérologiques ont démontré que l'infection par l'herpèsvirus humain de type 8 précède le développement tumoral du SK clinique. Les études suggèrent que l'HHV-8 est sexuellement transmissible et indiquent également que l'infection virale par l'HHV-8 n'est pas aussi fréquente au sein de la population générale que l'infection par d'autres herpèsvirus. Différentes épreuves sérologiques ont indiqué des taux de prévalence variables pour les anticorps anti-HHV-8 dans la population adulte normale, allant de 4 % à 25 %. Il reste à établir les taux de prévalence avec plus de précision, en utilisant une combinaison de tests mesurant à la fois les anticorps contre les antigènes lytiques et latents, et en normalisant les systèmes de test. Lorsque les tests portant à la fois sur les anticorps lytiques et latents sont utilisés, presque tous les patients atteints du SK et environ 90 % des hommes homosexuels infectés par le VIH présentent des anticorps anti-HHV-8 (9-14).

Parmi les essais sérologiques, il a été démontré que l'immunofluorescence était une méthode sérologique pratique et précise pour la détection et la semi-quantification des anticorps IgG anti-HHV-8. En raison de la nécessité de détecter les anticorps contre les antigènes à la fois lytiques et latents, SCIMEDX possède deux tests de fluorescence indirecte pour la détermination des anticorps anti-HHV-8, avec deux types de lames pour la détection différentielle des anticorps contre les antigènes lytiques et latents.

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 30 minutes, l'anticorps spécifique aux antigènes anti-HHV8 forme un complexe antigène/anticorps avec les antigènes anti-HHV8 des cellules infectées. L'anticorps non spécifique et d'autres protéines sériques non activées sont éliminés par une brève étape de lavage. L'IgG de chèvre anti-humaine conjuguée à de la fluorescéine est alors ajoutée aux puits de la lame de verre. Le conjugué anti-IgG se lie à l'IgG 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-HHV8 lytique : Lames de lymphocytes humains infectés par le HHV8 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 du puits.

Contrôle positif aux IgG du HHV8 : Chaque flacon contient 0,5 ml de contrôle humain positif à l'anticorps anti-IgG du HHV8. Ce composant est un liquide. 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 IgG du HHV8 : Chaque flacon contient 0,5 ml de contrôle humain négatif à l'anticorps anti-IgG du HHV8. Ce composant est un liquide. 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'IgG anti-humaines (inactivées) (chaînes lourdes et légères) de chèvre conjuguées à la fluorescéine avec contre-colorants : bleu d'Evans et rhodamine. Le conjugué de fluorescéine est une association d'IgG 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. 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. 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 matériel 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'immunodéficience 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. 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
Mot de signal	ATTENTION	
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.

Les échantillons sériques appariés visant à démontrer la séroconversion ou une augmentation significative du titre doivent être prélevés entre 7 et 14 jours d'écart, stockés, puis testés simultanément.

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 qualitative de l'anticorps anti-IgG, préparer une dilution de dépistage à 1:64 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.
2. Pour le titrage quantitatif des échantillons sériques, préparer des dilutions en série à deux volumes des échantillons de sérum dans du PBS, en commençant par une dilution à 1:64, et en ajoutant des volumes équivalents de sérum ou de plasma dilués et du PBS pour chaque dilution consécutive.
3. Sortir les lames de la poche de protection et appliquer 1 goutte (environ 20 µl) 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).
4. Incuber les lames dans une chambre humide pendant 30 minutes à 37 °C.
5. Rincer les lames sous un léger filet de tampon. Éviter de diriger le liquide vers les puits.
6. Laver les lames pendant 10 minutes en changeant le tampon PBS au bout de 5 minutes. Agiter les lames en secouant de haut en bas le portoir dans le tampon.
7. Absorber le masque de peinture entourant les puits de test à l'aide des papiers absorbants spéciaux.
8. Appliquer une goutte de conjugué prêt à l'emploi dans chaque puits de test.
9. Répéter les étapes 4 (incubation), 5 (rinçage au PBS), 6 (10 minutes de lavage au PBS) et 7 (papier absorbant).
10. Appliquer le milieu de montage au glycérol et la lame de verre de 22 X 50 mm.
11. 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-IgG du HHV8. Le schéma de fluorescence des cellules infectées par le HHV8 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 HHV8 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 15 et 50 %. Le titrage des échantillons sériques d'IgG du HHV8 positifs fournit 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-IgG du HHV8.

Importance de l'interprétation

1. Fluorescence non discernable des cellules infectées observée à la dilution de dépistage.	1. L'échantillon analysé est négatif aux anticorps anti-IgG du HHV8.
2. Fluorescence positive spécifique des cellules infectées observée à la dilution de dépistage ou à des dilutions supérieures.	2. L'échantillon analysé est positif aux anticorps anti-IgG du HHV8, ce qui indique une infection antérieure au HHV6. Une séroconversion ou une multiplication par quatre ou plus du titre des anticorps anti-IgG dans des échantillons de sérum appariés indique une infection récente au HHV8.
3. Fluorescence observée à la fois dans les cellules infectées et non infectées.	3. L'échantillon analysé présente une réaction non spécifique.

Remarque : La réalisation d'un test spécifique à l'anticorps anti-IgM du HHV8 facilite le diagnostic d'infection au HHV8 en cours.

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-HHV8 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-HHV8 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 prêt à l'emploi pour fournir 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. Tirer le contrôle positif lors de la première utilisation du kit. Le titre obtenu lors de l'analyse peut différer de la dilution listée 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.
- Un résultat positif isolé pour l'anticorps anti-IgG du HHV8 n'est significatif que dans la mesure où il indique un contact antérieur avec le virus ou une infection par celui-ci. À des fins épidémiologiques, un résultat isolé est utile. Cependant, il ne doit pas être utilisé comme indication d'une infection en cours ou récente par le virus. Afin de déterminer si l'infection est en cours ou récente, des analyses simultanées d'échantillons de sérum ou de plasma appariés prélevés entre 7 et 14 jours d'écart doivent être réalisées. Une multiplication du titre par quatre ou plus entre le premier et le second échantillon indique une infection en cours ou récente.
- Des réactions positives non spécifiques telles que 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 HHV8. Par conséquent, l'observation d'une réaction auto-immune ne peut éliminer la possibilité d'une infection par le HHV8.

Valeurs attendues

Lorsque les tests portant à la fois sur les anticorps lytiques et latents sont utilisés, presque tous les patients atteints du SK et environ 90 % des hommes homosexuels infectés par le VIH présentent des anticorps anti-HHV8. Différentes épreuves sérologiques, y compris les tests d'immunofluorescence, les essais d'immuno-absorption enzymatique (ELISA) et les épreuves utilisant la méthode de l'immunoblot, ont indiqué des taux de prévalence variables pour les anticorps anti-HHV-8 dans la population adulte normale, allant de seulement 4 % à 25 %. En raison de la sensibilité et de la spécificité variables des différents essais d'immunologie, d'autres tests avec normalisation des systèmes de détection seront nécessaires pour clarifier les taux de prévalence. La séropositivité n'est pas courante avant la puberté.

Caractéristiques de performance

Sensibilité et spécificité relatives : Ce kit a été comparé à un kit ELISA HHV8 ORF 65 pour déterminer la sensibilité et la spécificité entre les deux tests. Dans cette étude, 311 échantillons de sérum humain constitués d'échantillons provenant de patients atteints du sarcome de Kaposi, de l'herpèsvirus humain de type 6 et de myélomes multiples ont été testés. Des sérums provenant de donneurs de sang sains ont également été inclus. Les données sont résumées dans le tableau ci-dessous.

HHV8 IFA de SCIMEDX

Samples	HHV8 Lytic Status	Reactive	Non-reactive	Total
Kaposi's	Reactive	102	0	

Alternate ELISA	Sarcoma	Non-reactive	0	0	102
	Blood Donors	Reactive	0	1	194
		Non-reactive	5	188	
	Multiple Myelomas	Reactive	0	0	10
		Non-reactive	0	10	
	HHV6 Positive	Reactive	0	0	5
		Non-reactive	0	5	
	Total		107	204	311

Accordo sorológico = 305/311 = 98.1%

Reproductibilité : Six échantillons séropositifs avec divers titres (de 1:64 à 1:2048) et un échantillon séronégatif ont été dilués deux fois en série et dosés trois fois chacun sur deux jours différents et le résultat final a été déterminé. Les vingt et un titres au résultat final étaient conformes à la spécification de plus ou moins une dilution de 1:2.

Titre identique 18/21
± une dilution de 1:2 3/21

Spécificité : Le test d'immunofluorescence pour l'HHV-8 lytique est un test spécifique pour la détection d'anticorps contre l'HHV-8. Trente-et-un des trente-cinq sérums positifs pour l'anticorps IgG contre le cytomégalo virus (CMV), le virus d'Epstein-Barr (EBV), l'herpèsvirus humain de type 1 (HSV-1), l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) ou le virus varicelle-zona (VZV), ou une combinaison de tous ces virus, se sont avérés négatifs aux tests pour l'anticorps IgG anti-HHV-8 avec ce test d'immunofluorescence. Le tableau ci-dessous résume les données.

Données sur la réactivité croisée - Test IgG HHV8 de SCIMEDX

Disease Type	Total Samples	Positive Result
CMV	6	3/6
EBV	21	0/21
HSV1	1	0/1
HHV6	6	1/6
VZV	1	0/1
Total	35	4/35

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. Voir le tableau ci-dessous.

Stabilité en temps réel

Slide Lot	Control	Endpoint Titer at Release	Titer at 24 months
#1	Positive	1:512	1:256
	Negative	—	—
#2	Positive	1:512	1:512
	Negative	—	—
#3	Positive	1:512	1:256
	Negative	—	—

Bibliographie

- Chang, Y., E. Cesarman, M.S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D.M. Knowles, and P.S. Moore. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **265**: 1865-1869.
- Levy, J.A. 1997. Three new human herpesviruses (HHV6, 7 and 8). *Lancet* **349**: 558-562.
- Beral, V. 1996. Epidemiology of Kaposi's sarcoma, in *Cancer Surveys*, vol. 10: Cancer, HIV, and AIDS (Beral, V., Jaffe, H.W., Weiss, R., eds) pp5-22. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Ganem, D. 1996. Human herpesvirus 8 and the biology of Kaposi's sarcoma. *Virology* **7**: 325-332.
- Luppi, M., and G. Torelli. 1996. The new lymphotropic herpesviruses (HHV-6, HHV-7, HHV8) and Hepatitis C Virus (HCV) in human lymphoproliferative diseases: an overview. *Haematologica* **81**: 265-281.
- Kim, S., S.H. Kang, J. Moon, M.S. Kim, Y.S. Kim, K. Park. 1998. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* **30**: 3165.
- Miller, G. M. Riggsby, L. Heston, E. Grogan, R. Sun, C. Metroka, J. Levy, S.-J. Gao, Y. Chang, P. Moore. 1995. Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *New Engl J Med* **334**:1291-1297.
- Lenette, E.T., D.J. Blackbourn, and J.A. Levy. 1996. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* **348**: 858866.
- Blackbourn, D.J., J. Ambrozziak, E. Lenette, M. Adams, B. Ramachandran, and J.A. Levy. 1997. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor. *Lancet* **349**: 609-611.
- Simpson, G.R., T.F. Schultz, D. Whitby, P.M. Cook, C. Boshoff, L. Rainbow, M.R. Howard, S.Gao, R.A. Bohenzky, P. Simmonds, C. Lee, A. de Ruiter, A. Hatzakis, R.S. Tedder, I.V.D. Weller, R.A. Weiss, and P.S. Moore. 1996. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* **349**: 1133-38.
- Kedes, D.H., D. Ganem, N. Ameli, P. Baccetti, and R. Greenblatt. 1997. The prevalence of serum antibody to human herpesvirus 8 (Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus) among HIV-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. *JAMA* **277**: 478-481.
- Kedes, D.H., E. Operskalski, M. Busch, K. Kohn, J. Flood, D. Ganem. 1996. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Med.* **2**: 918-921.
- Martin, J.N., D.E. Ganem, D.H. Osmond, K.A. Page-Shafer, D. Macrae, and D.H. Kedes. 1998. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *New Engl. J Med.* **338**: 948-54.
- Chatlynne, L.G., W. Lapps, M. Handy, Y.Q. Huang, R. Masood, A.S. Hamilton, J.W. Said, H.P. Koeffler, M.H. Kaplan, A. Friedman-Kien, P.S. Gill, J.E. Whitman, and D.V. Ablashi. 1998. Detection and titration of human herpesvirus-8 specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* **92**: 53-58.

SCIMEDX CORPORATION
533 Hightstown 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





INDIREKTER FLUORESCENZ-ASSAY AUF IgG-ANTIKÖRPER GEGEN HUMANES HERPESVIRUS 8 (HHV8 LYTIC)

Nur zum Export bestimmt

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

I-HV802G	120 Tests
I-HV804G	40 Tests

Verwendungszweck

Der indirekte Immunfluoreszenz-Assay (IFA) für lytische IgG-Antikörper gegen das humane Herpesvirus 8 (HHV8) von SCIMEDX Corp. dient zum qualitativen und semi-quantitativen Nachweis von IgG (Immunglobulin G) Antikörpern gegen HHV8 lytische Antigene in Humanserum oder Plasma. Der Nachweis von IgG-Antikörpern gegen HHV8 beim Menschen kann als Hilfe bei der Diagnose einer primären Infektion bzw. Reaktivierung/erneuten Infektion mit diesem Virus oder als Nachweis einer zurückliegenden Infektion mit HHV8 dienen.

Einführung und Übersicht über die Testverfahren

Das humane Herpesvirus 8 (HHV8), das auch als Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV) bezeichnet wird, wurde 1994 von Chang in Kaposi-Sarkom-Läsionen identifiziert. Spezifische DNA-Sequenzen, die Regionen des Herpesvirus saimiri und Epstein-Barr-Virus sehr ähnlich waren, wurden in allen Formen von Kaposi-Sarkom weltweit entdeckt, unabhängig davon, ob das Kaposi-Sarkom mit einer HIV-Infektion assoziiert ist oder nicht. Das klassische KS ist eine seltene maligne Erkrankung, die bei älteren Männern im Mittelmeerraum auftritt. Bei Patienten mit AIDS ist KS das am häufigsten vorkommende Neoplasma. KS wurde außerdem bei Empfängern von Transplantaten und in bestimmten afrikanischen Populationen beobachtet. HHV8 wurde auch mit Body-Cavity-Lymphom (ebenfalls als Primary-Effusion-Lymphom bezeichnet), Multicentric Castleman Disease (MCD), non-Hodgkins-Lymphom und Plasmazytom (Kahler-Krankheit) assoziiert. (1-6)

HHV8 wird inzwischen als Gamma-Herpesvirus klassifiziert und gehört zum Genus Rhadinovirus. Es ähnelt in seinem Tropismus für B-Zellen und der Fähigkeit, in einem latenten Zustand zu existieren, dem EBV-Virus. Obwohl von Body-Cavity-Lymphomen angelegte Zellkulturen oft mit HHV8 und EBV infiziert sind, sind einige der Kulturen EBV-negativ. Wenn die Zellkulturen latent mit HHV8 infiziert sind, können sie chemisch zur Herstellung eines aktiv replizierenden Virus angeregt werden. Daher haben diese HHV8-Zelllinien, die nicht mit EBV infiziert sind, serologische Studien ermöglicht, bei denen Antikörper gegen verschiedene Virusproteine nachgewiesen werden können, wie z. B. latente Antigene, insbesondere Latenz-assoziierte nukleäre Antigene (LANA) und lytische Antigene, die sich durch replizierendes Virus exprimieren. (7-8)

Serologische Studien haben bewiesen, dass eine Infektion mit HHV8 der Tumorentwicklung des klinischen Kaposi-Sarkoms vorangeht. Studien weisen darauf hin, dass HHV8 sexuell übertragen wird und dass eine Virusinfektion mit HHV8 in der allgemeinen Population nicht so häufig vorkommt wie mit anderen Herpesviren. Verschiedene serologische Tests haben unterschiedliche Prävalenzraten für HHV8-Antikörper in der gesunden Erwachsenenpopulation ergeben, von 4 % bis 25 %. Die Prävalenzraten müssen anhand einer Kombination von Tests, bei denen Antikörper gegen lytische sowie latente Antigene gemessen werden, und einer Standardisierung von Testsystemen noch genauer bestimmt werden. Wenn sowohl lytische als auch latente Antikörpertests verwendet werden, werden bei fast allen KS-Patienten und ca. 90 % der mit HIV infizierten homosexuellen Männer Antikörper gegen HHV8 nachgewiesen. (9-14)

Der IFA-Test hat sich unter den serologischen Assays als praktische und genaue serologische Methode zum Nachweis und zur Semiquantifizierung von IgG-Antikörpern gegen HHV8 erwiesen. Da Antikörper sowohl gegen lytische als auch latente Antigene nachgewiesen werden müssen, bietet SCIMEDX Corp. zwei indirekte Immunfluoreszenztests zum Nachweis von HHV8-Antikörpern an, mit zwei Arten von Objektträgern zur Differenzierung des Nachweises von Antikörpern gegen lytische und latente Antigene.

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 30 Minuten bilden für HHV8-Antigene typische Antikörper einen Antigen-/Antikörperkomplex mit den HHV8-Antigenen in den infizierten Zellen. Unspezifische Antikörper und andere freie Serumproteine werden in einem kurzen Waschvorgang entfernt. Fluoreszein-konjugiertes Antihuman-IgG von der Ziege wird dann in die Kavitäten auf dem Glas-Objektträger gegeben. Das Anti-IgG-Konjugat vermischt sich während der 30-minütigen Inkubationszeit mit Human-IgG (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

HHV8-Antigen-Objektträger: Objektträger mit menschlichen Lymphozyten, die HHV8-lytische Antigene exprimieren, 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.

HHV8 IgG-positive Kontrolle: Jedes Fläschchen enthält 0,5 ml HHV8 IgG-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.

HHV8 IgG-negative Kontrolle: Jedes Fläschchen enthält 0,5 ml HHV8 IgG-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-IgG von der Ziege (schwere und leichte Kette) mit Evans Blue- und Rhodamin-Gegenfärbung. Das Fluoreszein-Konjugat ist eine Konjugation aus mithilfe von Affinitätschromatographie gereinigtem Antihuman-IgG und Fluoreszein-Isocyanat (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 Pulverpulver 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 ihres 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
Piktogramm		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.
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.
- Serumprobenpaare, mit denen eine Serokonversion bzw. ein signifikanter Titeranstieg nachgewiesen werden soll, sollten in einem Abstand von 7 bis 14 Tagen entnommen, gelagert und dann gleichzeitig getestet werden.

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 Farbeschale 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:

1. 10x Okular
2. 16x oder 40x Objektiv
3. Epi-Illuminator mit 50-W-Halogenlampe
4. FITC-Erregerfilter KP490
5. Gelb-Absorptionsfilter K530
6. 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 qualitativen IgG-Antikörper-Nachweis eine Screening-Lösung im Verhältnis 1:64 für jede Probe in phosphorgepufferter Kochsalzlösung herstellen. Alle Verdünnungen in einem Mindestvolumen von 0,10 ml mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel herstellen.
- Für eine quantitative Titrierung der Seren eine zweifache Serenverdünnung der Serumprobe in PBS herstellen. Dabei mit einer Verdünnung von 1:64 beginnen und gleiche Mengen an verdünntem Serum oder Plasma und PBS für jede Verdünnung zugeben.
- 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 30 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 speziellen Löschpapier abtupfen.
- Einen Tropfen des gebrauchsfertigen Konjugats in jede Kavität geben.
- Die Schritte 4 (Inkubation), 5 (PBS-Spülung), 6 (10-minütige PBS-Wasche) und 7 (Abtupfen) wiederholen.
- Das Glycerol-Eindeckmittel und das Deckglas (22 x 50 mm) anbringen.
- 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 Feuchtigkeitverlust 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

1. Eine leuchtend grüne fluoreszierende Färbung der infizierten Zellen weist auf eine HHV8 IgG-Antikörper-positive Reaktion hin. Bei lytischem Antigen fluoresziert die gesamte Zelle, sowohl Zytoplasma als auch der Kern. Zur internen Kontrolle enthält jede Kavität auf dem Objektträger sowohl mit HHV8 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 15 % und 50 %. Die Titrierung positiver HHV8 IgG-Seren liefert quantitative Informationen. In einer Titrierungsreihe gilt die höchste Serumverdünnung, bei der eine Reaktion von 1* eintritt, als Endpunkt.
2. Die Abwesenheit einer spezifischen fluoreszierenden Färbung der infizierten Zellen weist auf eine negative Reaktion auf HHV8 Antikörper hin.

Bedeutung der Auswertung

1. Keine feststellbare Fluoreszenz der infizierten Zellen mit der Screening-Lösung	1. Probe ist HHV8 IgG-Antikörper-negativ.
2. Spezifische positive Fluoreszenz der infizierten Zellen mit der Screening-Lösung oder bei höheren Verdünnungen	2. Probe ist HHV8 IgG-Antikörper-positiv. Dies weist auf eine zurückliegende HHV8-Infektion hin. Eine Serokonversion bzw. ein mindestens vierfach höherer Anstieg im IgG-Antikörper-Titer bei Serumprobenpaaren weist auf eine kürzlich erfolgte Infektion mit HHV8 hin.
3. Fluoreszenz sowohl bei infizierten als auch nicht infizierten Zellen	3. Die Probe weist eine unspezifische Reaktion auf.

Hinweis: Die Durchführung eines HHV8 IgM-Antikörper-spezifischen Tests unterstützt die Diagnose einer frischen HHV8-Infektion.

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 HHV8-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 HHV8-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 Zellsupstrat reagiert.

1* Verdünnungshinweis

Die positive Kontrolle in diesem Kit ist einsatzbereit und bietet 2+ und 4+ Fluoreszenzintensität Bei der Prüfung. 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 von der angegebenen Verdünnung 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 der 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. Ein einzelnes positives Ergebnis für HHV8 IgG-Antikörper ist nur insofern signifikant als es auf einen früheren Kontakt bzw. eine Infektion mit dem Virus hinweist. Ein einzelnes Ergebnis ist hilfreich für epidemiologische Zwecke. Es sollte jedoch nicht als Hinweis auf eine frische oder kürzlich erfolgte Infektion mit dem Virus verwendet werden.

Um eine frische oder kürzlich erfolgte Infektion zu bestimmen, wird ein gleichzeitiger Test von oder Plasma- oder Serumprobenpaaren empfohlen. Die Proben sollten im Abstand von 7 bis 14 Tagen entnommen werden. Ein mindestens vierfacher Titeranstieg zwischen der ersten und zweiten Probe weist auf eine frische oder kürzlich erfolgte Infektion hin.

3. 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 HHV8-Reaktion verdecken. Daher schließt das Auftreten einer Autoimmunreaktion nicht die Möglichkeit einer HHV8-Infektion aus. Ein Vergleich mit der positiven Kontrolle, mit ihrer Partikelreaktion oder das Testen der Probe mit einem spezifischen Test für ANA kann bei der Eliminierung falscher positiver Ergebnisse helfen.

Referenzwerte

Wenn sowohl lytische als auch latente Antikörpertests verwendet werden, werden bei fast allen KS-Patienten und ca. 90 % der mit HIV infizierten homosexuellen Männer Antikörper gegen HHV8 nachgewiesen. Verschiedene serologische Tests (wie z. B. IFA, ELISA und Immunoblot) haben unterschiedliche Prävalenzraten für HHV8-Antikörper in der gesunden Erwachsenenpopulation ergeben, von 4 % bis 25 %. Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Immunoassays sind weitere Tests mit einer Standardisierung der Nachweissysteme erforderlich, um die Prävalenzraten zu klären. Eine Seropositivität vor der Pubertät ist selten.

Leistungscharakteristika

Relative Sensitivität und Spezifität: Dieses Kit wurde mit einem im Handel erhältlichen HHV8 ORF 65 ELISA-Kit verglichen, um die Unterschiede in Sensitivität und Spezifität zwischen den beiden Tests zu bestimmen. In der Studie wurden 311 Humanserumproben von Patienten mit Kaposi-Sarkom, humanem Herpesvirus 6 und Plasmazytom getestet. Außerdem wurden Seren von gesunden Spendern getestet. Die Daten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

SCIMEDX IFA					
	Gesamt	HHV8-lytischer Status	Reaktiv	Nicht reaktiv	Gesamt
Alternativer ELISA-Test	Kaposi-Sarkom	Reaktiv	102	0	102
		Nicht reaktiv	0	0	
	Blutspender	Reaktiv	0	1	194
		Nicht reaktiv	5	188	

Plasmazytome	Reaktiv	0	0	10
	Nicht reaktiv	0	10	
HHV6-positiv	Reaktiv	0	0	5
	Nicht reaktiv	0	5	
Gesamt		107	204	311

Serologische Übereinstimmung: = 305/311 = 98,1 %

Reproduzierbarkeit: Sechs seropositive Proben mit unterschiedlichen Titern (1:64 bis 1:2048) sowie eine seronegative Probe wurden nacheinander zweifach verdünnt und dreimal an zwei verschiedenen Tagen getestet. Der Endpunkt wurde bestimmt. Alle einundzwanzig Endpunkt-Titer lagen innerhalb der Spezifikationen für ± eine zweifache Verdünnung.

Identischer Titer
± eine zweifache Verdünnung

18/21
3/21

HHV8-Spezifität: Der IFA-Test für HHV8 lytisch ist ein spezifischer Test zum Nachweis von Antikörpern gegen HHV8. Einunddreißig von fünfunddreißig Seren, die positive IgG-Antikörper-Ergebnisse für Zytomegalievirus (CMV), Epstein-Barr-Virus (EBV) oder humanes Herpesvirus 1 (HSV1), humanes Herpesvirus 6 (HHV6) oder Varicella-Zoster-Virus (VZV) bzw. eine beliebige Kombination dieser Viren aufwiesen, erzeugten negative Ergebnisse für HHV8 IgG-Antikörper mit diesem IFA-Test. Die untenstehende Tabelle enthält eine Zusammenfassung der Daten.

Daten zur Kreuzreaktivität: SCIMEDX HHV8 IgG-Test

Art der Erkrankung	Proben gesamt	Positives Ergebnis
CMV	6	3/6
EBV	21	0/21
HSV1	1	0/1
HHV6	6	1/6
VZV	1	0/1
Gesamt	35	4/35

Echtzeitstabilität:

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

Echtzeitstabilität

Objektträger-Charge	Kontrolle	Anfänglicher Endpunkt-Titer	Endpunkt-Titer nach 24 Monaten
Nr. 1	Positiv	1:512	1:256
	Negativ	–	–
Nr. 2	Positiv	1:512	1:512
	Negativ	–	–
Nr. 3	Positiv	1:512	1:256
	Negativ	–	–

Literaturnachweis

1. Chang, Y., E. Cesarman, M.S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D.M. Knowles, and P.S. Moore. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **265**: 1865-1869.
2. Levy, J.A. 1997. Three new human herpesviruses (HHV6, 7 and 8). *Lancet* **349**: 558-562.
3. Beral, V. 1996. Epidemiology of Kaposi's sarcoma, in *Cancer Surveys*, vol. 10: Cancer, HIV, and AIDS (Beral, V., Jaffe, H.W., Weiss, R., eds) pp5-22. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
4. Ganem, D. 1996. Human herpesvirus 8 and the biology of Kaposi's sarcoma. *Virology* **7**: 325-332.
5. Luppi, M., and G. Torelli. 1996. The new lymphotropic herpesviruses (HHV-6, HHV-7, HHV8) and Hepatitis C Virus (HCV) in human lymphoproliferative diseases: an overview. *Haematologica* **81**: 265-281.
6. Kim, S., S.H. Kang, J. Moon, M.S. Kim, Y.S. Kim, K. Park. 1998. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* **30**: 3165.
7. Miller, G. M. Rigsby, L. Heston, E. Grogan, R. Sun, C. Metroka, J. Levy, S.-J. Gao, Y. Chang, P. Moore. 1995. Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *New Engl J Med* **334**: 1291-1297.
8. Lennette, E.T., D.J. Blackbourn, and J.A. Levy. 1996. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* **348**: 858866.
9. Blackbourn, D.J., J. Ambrozak, E. Lennette, M. Adams, B. Ramachandran, and J.A. Levy. 1997. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor. *Lancet* **349**: 609-611.
10. Simpson, G.R., T.F. Schultz, D. Whitby, P.M. Cook, C. Boshoff, L. Rainbow, M.R. Howard, S.Gao, R.A. Bohenzky, P. Simmonds, C. Lee, A. de Ruiter, A. Hatzakis, R.S. Tedder, I.V.D. Weller, R.A. Weiss, and P.S. Moore. 1996. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* **348**: 1133-38.
11. Kedes, D.H., D. Ganem, N. Ameli, P. Baccetti, and R. Greenblatt. 1997. The prevalence of serum antibody to human herpesvirus 8 (Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus) among HIV-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. *JAMA* **277**: 478-481.
12. Kedes, D.H., E. Operskalski, M. Busch, K. Kohn, J. Flood, D. Ganem. 1996. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Med.* **2**: 918-921.
13. Martin, J.N., D.E. Ganem, D.H. Osmond, K.A. Page-Shafer, D. Macrae, and D.H. Kedes. 1998. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *New Engl J Med.* **338**: 948-54.
14. Chatlynne, L.G., W. Lapps, M. Handy, Y.Q. Huang, R. Masood, A.S. Hamilton, J.W. Said, H.P. Koeffler, M.H. Kaplan, A. Friedman-Kien, P.S. Gill, J.E. Whitman, and D.V. Ablashi. 1998. Detection and titration of human herpesvirus-8 specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* **92**: 53-58.

SCIMEDX CORPORATION
53 Richboynton 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 DI FLUORESCENZA INDIRECTA PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI IgG LITICI CONTRO L'HERPESVIRUS UMANO 8 (HHV8)

Solo per l'esportazione
Per uso *diagnostico in vitro*.

I-HV802G 120 Tests
I-HV804G 40 Tests

Uso previsto

Il saggio a fluorescenza indiretta (IFA) SCIMEDX Corp. per la determinazione degli anticorpi IgG litici contro l'antigene dell'herpesvirus umano 8 (HHV8) è destinato al rilevamento qualitativo e semiquantitativo degli anticorpi IgG (immunoglobuline G) contro gli antigeni litici dell'HHV8 nel siero o nel plasma umano. La determinazione di anticorpi IgG anti-HHV8 in campioni umani può essere utilizzata come ausilio nella diagnosi dell'infezione primaria o della riattivazione/reinfezione con tale virus o può fornire un'evidenza dell'infezione precedente con HHV8.

Introduzione e riepilogo delle procedure d'analisi

L'herpesvirus umano 8 (HHV8), conosciuto anche come herpesvirus associato al sarcoma di Kaposi (KSHV), è stato identificato nel 1994 da Chang dalle lesioni del sarcoma di Kaposi (KS). È stato scoperto che le sequenze uniche di DNA che ricordano molto le regioni dell'herpesvirus saimiri e del virus di Epstein-Barr esistono in tutte le forme di sarcoma di Kaposi del mondo, indipendentemente dal fatto che il KS sia associato o meno all'infezione del virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Il KS classico è un tumore maligno raro che colpisce gli uomini anziani del Mediterraneo. Il KS è il neoplasma più frequente nei pazienti con sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). È stato osservato anche in individui ricevitori di trapianti e in alcune popolazioni africane. Inoltre l'HHV8 è stato associato anche ai linfomi delle cavità corporee, chiamati anche linfomi da effusione primaria, alla malattia di Castleman multicentrica, al linfoma non Hodgkin e al mieloma multiplo (1-6). L'HHV8 ora è classificato come un herpesvirus gamma, del genere Rhadinovirus e ricorda l'EBV per il tropismo per le cellule B e per la capacità di rimanere in forma latente. Sebbene le colture cellulari sviluppate dai linfomi delle cavità corporee spesso sono coinfezionate con HHV8 e EBV, alcune di esse sono EBV-negative. Se le colture cellulari sono infette con HHV8 in fase latente, possono essere indotte chimicamente a produrre virus in replicazione attiva. Quindi queste linee cellulari infette con HHV8, ma EBV-negative, sono state utilizzate per gli studi sierologici al fine di rilevare gli anticorpi contro diverse proteine virali, inclusi gli antigeni latenti e in particolare modo gli antigeni nucleari associati alla latenza (LANA) e gli antigeni litici espressi dal virus replicante (7-8). Gli studi sierologici hanno mostrato che l'infezione da HHV8 precede lo sviluppo del tumore del KS clinico. Studi suggeriscono che l'HHV8 è sessualmente trasmesso e che l'infezione da HHV8 non è comune nella popolazione generale al contrario di altri herpesvirus. Diversi test sierologici hanno dimostrato varie frequenze di prevalenza per gli anticorpi HHV8 nella popolazione normale adulta, da frequenze basse del 4% a frequenze del 25%. È necessario stabilire frequenze di prevalenza più accurate con l'uso di una combinazione di test che misurano gli anticorpi contro antigeni sia litici che latenti e con la standardizzazione dei sistemi di analisi. Quando si utilizzano i test per la determinazione degli anticorpi contro antigeni litici e latenti, quasi tutti i pazienti affetti da KS e circa il 90% degli uomini omosessuali affetti da HIV mostrano gli anticorpi HHV8 (9-14). È stato dimostrato che l'IFA, tra i saggi sierologici, è un metodo sierologico pratico e accurato per il rilevamento e la semiquantificazione degli anticorpi IgG anti-HHV8. Per soddisfare la necessità di rilevare gli anticorpi contro antigeni litici e latenti, SCIMEDX Corp. ha due saggi a fluorescenza indiretta per la determinazione degli anticorpi HHV8 con due tipi di vetrini per la determinazione differenziale degli anticorpi contro antigeni litici e contro antigeni latenti.

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 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 30 minuti, l'anticorpo specifico contro gli antigeni dell'HHV8 forma un complesso antigene/anticorpo con gli antigeni dell'HHV8 nelle cellule infette. Con una breve fase di lavaggio vengono eliminati l'anticorpo non specifico e altre proteine sieriche che non hanno reagito. L'anticorpo di capra anti-IgG umana coniugato con fluoresceina è quindi applicato ai pozzetti del vetrino. Il coniugato anti-IgG si combina con le IgG 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 HHV8: vetrini con linfociti umani che esprimono gli antigeni litici dell'HHV8 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 IgG anti-HHV8: ogni fiala contiene 0,5 ml di controllo umano positivo per anticorpi IgG anti-HHV8. 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 IgG anti-HHV8: ogni fiala contiene 0,5 ml di controllo umano negativo per IgG anti-HHV8. 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 IgG anti-umana (inattivata) di capra (catene pesanti e leggere) coniugata con fluoresceina con coloranti di contrasto blu Evans e rodamina. Il coniugato con fluoresceina è un complesso costituito da IgG 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 coprioggettto: ogni fiala contiene 2,0 ml di glicerolo in tampone fosfato con ritardante della dissolvenza. 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.
- Separate 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 a 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. AVVERTENZA ATTENZIONE Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. P337+P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
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.
- Allo scopo di dimostrare la sierokonversione o il significativo aumento del titolo, si dovrebbero prelevare campioni in doppio a distanza di 7-14 giorni gli uni dagli altri, conservarli, quindi testarli contemporaneamente.

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 coprioggettto: vetrino di spessore n.1, 22 X 50 mm
- Microscopia 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 qualitativa di anticorpi IgG, preparare una diluizione di analisi di 1:64 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 titolazione quantitativa dei sieri, eseguire due diluizioni seriali dei campioni di siero in PBS a partire da una diluizione di 1:64, aggiungendo volumi equivalenti di siero o plasma diluito e PBS per ogni diluizione consecutiva.
- Togliere i vetrini dal sacchetto protettivo e applicare 1 goccia (circa 20 µl) 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 30 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.
- Applicare una goccia del coniugato pronto per l'uso a ogni pozzetto del test.
- Ripetere i passaggi 4 (incubazione), 5 (risciacquo con PBS), 6 (lavaggio di 10 minuti in PBS) e 7 (asciugatura).
- Applicare il mezzo di montaggio a base di glicerolo e il vetrino coprioggettto da 22 x 50 mm.
- 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 IgG anti-HHV8. Per l'antigene litico, la fluorescenza sarà presente nella cellula intera, sia citoplasma che nucleo. Per fornire un controllo interno, ogni pozzetto del vetrino per microscopio contiene sia cellule infette che non infette con HHV8. 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'infettività delle cellule varia dal 15% al 50%. La titolazione dei sieri positivi per IgG anti-HHV8 fornisce le 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 IgG anti-HHV8.

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 IgG anti-HHV8.
2. Si riscontra fluorescenza positiva specifica delle cellule infette alla diluizione di analisi o a diluizioni più alte.	2. Il campione del test è positivo per gli anticorpi IgG anti-HHV8 indicando la precedente infezione con HHV8. La sierconversione o l'aumento di quattro volte o anche maggiore del titolo degli anticorpi IgG in coppie di campioni di siero indica una recente infezione da HHV8.
3. Si riscontra fluorescenza sia nei campioni infetti che in quelli non infetti.	3. Il campione del test mostra una reazione non specifica.

Attenzione: l'esecuzione di un test specifico per gli anticorpi IgM HHV8 aiuta nella diagnosi di un'infezione da HHV8 in corso.

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 HHV8 fornito con questo kit indica una reazione con intensità 2*-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 HHV8 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 un liquido 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 dalla diluizione indicata 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.
- Un singolo risultato positivo per gli anticorpi IgG anti-HHV8 è significativo solo in quanto indica un contatto o un'infezione precedente con il virus. Per gli scopi epidemiologici è utile un solo risultato, ma non deve essere utilizzato come indicazione di un'infezione del virus recente o in corso. Per determinare l'infezione in corso o recente, si deve eseguire un'analisi simultanea delle coppie di campioni di plasma e di siero prelevati 7-14 giorni dopo. Un aumento di quattro volte o superiore del titolo tra il primo e il secondo campione indica un'infezione in corso o un'infezione recente.
- 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'HHV8. Ne consegue che l'osservazione di una reazione autoimmune non può eliminare la possibilità di infezione dell'HHV8. Per eliminare questi risultati falsi positivi può essere utile confrontare il controllo positivo con la reazione positiva o testare i campioni con un saggio per la determinazione degli ANA.

Valori attesi

Quando sono stati utilizzati i test per la determinazione degli anticorpi contro gli antigeni litici e latenti, quasi tutti i pazienti affetti da KS e circa il 90% degli uomini omosessuali affetti da HIV mostravano gli anticorpi HHV8. Diversi test sierologici, inclusi IFA, ELISA e i saggi di immunoblotting, hanno dimostrato varie frequenze di prevalenza per gli anticorpi HHV8 nella popolazione normale adulta, da frequenze basse del 4% a frequenze del 25%. Data la differente sensibilità e specificità dei vari saggi immunologici, sono necessarie ulteriori analisi con la standardizzazione dei sistemi di rilevazione per poter chiarire le frequenze di prevalenza. La sieropositività non è comune prima della pubertà.

Caratteristiche prestazionali

Sensibilità e specificità relative: Questo kit è stato confrontato con un kit ELISA ORF 65 HHV8 per determinare la sensibilità e la specificità tra i due test. Lo studio ha testato 311 campioni di siero umano, costituiti da campioni di pazienti affetti da sarcoma di Kaposi, herpesvirus 6 e mielomi multipli. Sono stati inclusi anche i sieri di donatori di sangue sani. I dati sono riassunti nella tabella seguente.

IFA SCIMEDX					
ELISA alternativo	Campioni	Stato HHV8	Reattivo	Non reattivo	Totale
	Sarcoma di Kaposi	Reattivo	102	0	102
		Non reattivo	0	0	
	Donatori di sangue	Reattivo	0	1	194
		Non reattivo	5	188	
	Mieloma multipli	Reattivo	0	0	10
		Non reattivo	0	10	
	Positivi per HHV6	Reattivo	0	0	5
		Non reattivo	0	5	
	Totale		107	204	311

Concordanza sierologica: =305/311 = 98.1%

Riproducibilità: Sei campioni sieropositivi con vari titoli (da 1:64 a 1:2048) e un campione sieronegativo sono stati diluiti serialmente due volte e analizzati tre volte ognuno in due giorni diversi ed è stato determinato l'endpoint. Tutti i ventuno titoli di endpoint erano all'interno delle specifiche di ± una doppia diluizione.

Titolo identico 18/21
± una, doppia diluizione 3/21

Specificità per l'HHV8 Il test IFA per l'HHV8 litico è un test specifico per la determinazione di anticorpi HHV8. Trentuno dei trentacinque sieri positivi per l'anticorpo IgG contro citomegalovirus (CMV), virus di Epstein-Barr (EBV), virus dell'herpes umano 1 (HHV1), virus dell'herpes umano 6 (HHV6), virus della varicella-zoster (VZV) oppure qualsiasi combinazione di questi virus sono risultati negativi per l'anticorpo IgG anti-HHV8 con questo test IFA. La tabella seguente riepiloga i dati.

Dati di reattività crociata - IgG anti-HHV8 SCIMEDX

Tipo di malattia	Campioni totali	Risultato positivo
CMV	6	3/6
EBV	21	0/21
HSV1	1	0/1
HHV6	6	1/6
VZV	1	0/1
Totale	35	4/35

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. I titoli di endpoint dei controlli positivo e negativo sono stati confrontati 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. Consultare la tabella seguente.

Stabilità in tempo reale

Lotto del vetrino	Controllo	Titolo di endpoint al rilascio	Titolo di endpoint a 24 mesi
#1	Positivo	1:512	1:256
	Negativo	-	-
#2	Positivo	1:512	1:512
	Negativo	-	-
#3	Positivo	1:512	1:256
	Negativo	-	-

Riferimenti bibliografici citati

- Chang, Y., E. Cesarman, M.S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D.M. Knowles, and P.S. Moore. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **265**: 1865-1869.
- Levy, J.A. 1997. Three new human herpesviruses (HHV6, 7 and 8). *Lancet* **349**: 558-562.
- Beral, V. 1996. Epidemiology of Kaposi's sarcoma, in *Cancer Surveys*, vol. 10: Cancer, HIV, and AIDS (Beral, V., Jaffe, H.W., Weiss, R., eds) pp5-22. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Ganem, D. 1996. Human herpesvirus 8 and the biology of Kaposi's sarcoma. *Virology* **7**: 325-332.
- Luppi, M., and G. Torelli. 1996. The new lymphotropic herpesviruses (HHV-6, HHV-7, HHV8) and Hepatitis C Virus (HCV) in human lymphoproliferative diseases: an overview. *Haematologica* **81**: 265-281.
- Kim, S., S.H. Kang, J. Moon, M.S. Kim, Y.S. Kim, K. Park. 1998. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* **30**: 3165.
- Miller, G. M. Rigsby, L. Heston, E. Grogan, R. Sun, C. Metroka, J. Levy, S.-J. Gao, Y. Chang, P. Moore. 1995. Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *New Engl J Med* **334**:1291-1297.
- Lenette, E.T., D.J. Blackbourn, and J.A. Levy. 1996. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* **348**: 858866.
- Blackbourn, D.J., J. Ambrozziak, E. Lenette, M. Adams, B. Ramachandran, and J.A. Levy. 1997. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor. *Lancet* **349**: 609-611.
- Simpson, G.R., T.F. Schultz, D. Whitby, P.M. Cook, C. Boshoff, L. Rainbow, M.R. Howard, S.Gao, R.A. Bohenzky, P. Simmonds, C. Lee, A. de Ruiter, A. Hatzakis, R.S. Tedder, I.V.D Weller, R.A Weiss, and P.S. Moore. 1996. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* **349**: 1133-38.
- Kedes, D.H., D. Ganem, N. Ameli, P. Baccetti, and R. Greenblatt. 1997. The prevalence of serum antibody to human herpesvirus 8 (Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus) among HIV-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. *JAMA* **277**: 478-481.
- Kedes, D.H., E. Operskalski, M. Busch, K. Kohn, J. Flood, D. Ganem. 1996. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Med.* **2**: 918-921.
- Martin, J.N., D.E. Ganem, D.H. Osmond, K.A. Page-Shafer, D. Macrae, and D.H. Kedes. 1998. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *New Engl. J Med.* **338**: 948-54.
- Chatlynne, L.G., W. Lapps, M. Handy, Y.Q. Huang, R. Masood, A.S. Hamilton, J.W. Said, H.P. Koeffler, M.H. Kaplan, A. Friedman-Kien, P.S. Gill, J.E. Whitman, and D.V. Ablashi. 1998. Detection and titration of human herpesvirus-8 specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* **92**: 53-58.

SCIMEDX CORPORATION
b3 Richtbynton 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





Prueba de inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos IgG frente al virus del herpes humano de tipo 8 (VHH-8)

Sólo para exportación

Para uso *diagnóstico in vitro*.
I-HV802G 120 Tests
I-HV804G 40 Tests

Uso previsto

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA) de SCIMEDX frente al virus herpes humano de tipo 8 (VHH-8 lítico) se ha diseñado para la detección cualitativa y semi-cuantitativa de anticuerpos IgG (Inmunoglobulina G) para antígenos HHV8 líticos en suero o plasma humano. La detección de anticuerpos IgG frente a VHH-8 en humanos se puede utilizar como una ayuda en el diagnóstico de la infección primaria o reactivación / reinfección con este virus, o puede proporcionar evidencia de infección anterior de VHH-8.

Introducción y resumen de procedimientos de ensayo

El virus del herpes humano de tipo 8 (VHH-8), también conocido como virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (VHSK), fue identificado en 1994 por Chang a partir de lesiones de SK. Se descubrió que las secuencias únicas de ADN que se asemejaban mucho a regiones del virus herpes Saimiri y el virus herpes Epstein-Barr existen en todas las formas de sarcoma de Kaposi en todo el mundo, si el SK se asocia o no con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El típico SK es una neoplasia poco frecuente que ocurre en ancianos de países mediterráneos. En pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), el SK es la neoplasia más frecuente. También se ha observado SK en receptores de trasplante y en ciertas poblaciones africanas. Además, el VHH-8 también se ha asociado con linfomas de cavidades, también denominado linfomas de efusión primaria, enfermedad de Castleman multicéntrica, linfoma no-Hodgkin y mieloma múltiple (1-6).

El VHH-8 está ahora clasificado como un virus herpes gamma en el género Rhadinovirus, y se asemeja al virus del Epstein-Barr (EBV) en su tropismo hacia las células B y en la capacidad de conservarse en un estado latente. Aunque los cultivos celulares establecidos a partir de linfomas de cavidades son a menudo co-infectados con VHH-8 y EBV, algunos de los cultivos son EBV negativos. Si los cultivos celulares están infectados de forma latente con VHH-8, pueden ser inducidos químicamente para producir la replicación activa del virus. Por lo tanto, estas líneas, no infectados por EBV HHV8, han hecho posible que los estudios serológicos para detectar anticuerpos contra diferentes proteínas virales, incluyendo antígenos latentes, especialmente latencia asociada a antígenos nucleares (LANA), y antígenos líticos expresados por virus replicante (7-8).

Los estudios serológicos han demostrado que la infección por VHH-8 precede al desarrollo de tumores de SK clínicos. Los estudios sugieren que el VHH-8 se transmite por vía sexual y también indican que la infección viral por VHH-8 no es tan común en la población general como los otros virus herpes. Diferentes pruebas serológicas han demostrado diferentes tasas de prevalencia para anticuerpos contra el virus VHH-8 en la población adulta normal, desde un mínimo de 4 % al 25 %. Aún no se han establecido determinaciones más precisas de las tasas de prevalencia, con el uso de una combinación de pruebas de medición de anticuerpos frente a antígenos latentes y líticos y la normalización de sistemas de ensayo. Cuando se utilizan test de anticuerpos líticos y latentes, casi todos los pacientes con SK y aproximadamente el 90 % de hombres homosexuales infectados por VIH muestran anticuerpos frente a VHH-8 (9-14).

Entre las pruebas serológicas, se ha demostrado que la IFA ha es un método serológico práctico y preciso para la detección y semi-cuantificación de anticuerpos IgG frente a VHH-8. Debido a la necesidad de la detección de anticuerpos frente a antígenos líticos y latentes, SCIMEDX dispone de dos pruebas serológicas IFA para la detección de anticuerpos frente a VHH-8, con dos tipos de diagnósticos para la detección diferencial de anticuerpos frente a antígenos líticos y latentes.

Principio de la prueba

Las pruebas serológicas IFA de SCIMEDX utilizan el método indirecto de detección de anticuerpos y detección de inmunidad. Las muestras de suero o plasma de pacientes se aplican a cultivos celulares que contienen antígenos virales inactivados provistos en pocillos demarcados en el portaobjetos de vidrio del microscopio. Durante una incubación de 30 minutos, el anticuerpo específico para antígenos del VHH-8 forma un complejo antígeno / anticuerpo con los antígenos del VHH-8 en las células infectadas. En una breve etapa de lavado, se eliminan el anticuerpo no específico y otras proteínas séricas que no reaccionan. El conjugado de IgG antihumano marcado con fluoresceína se aplica seguidamente a los pocillos en el portaobjetos de vidrio. El conjugado de IgG antihumano se combina con el IgG humano, si está presente, durante una incubación de 30 minutos. Después de un breve lavado para eliminar el conjugado que no ha reaccionado, se visualizan los portaobjetos por microscopía de fluorescencia. Una reacción positiva de anticuerpos se denota por fluorescencia de color verde fluorescente en los sitios antígenicos.

Materiales suministrados y condiciones de almacenamiento

Portas de antígeno del VHH-8: Portas de linfocitos humanos que expresan antígenos líticos del VHH-8 en cada pocillo de vidrio. Los portas están listos para su uso tras retirar la bolsa de protección. Almacenar a 2-8° C. Los portas son estables en estas condiciones de almacenamiento hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la bolsa.

Control positivo de IgG para VHH-8: Cada vial contiene control humano positivo de anticuerpos IgG frente a VHH-8 de 0,5 ml. Este componente es un líquido listo para su uso. Almacenar a 2-8° C. El control positivo líquido es estable en estas condiciones de almacenamiento hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

Control negativo de IgG para VHH-8: Cada vial contiene VHH-8 de 0,5 ml. Control humano negativo de anticuerpos IgG. Este componente es un líquido listo para su uso. Almacenar a 2-8° C. El control negativo líquido es estable en estas condiciones de almacenamiento hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

Conjugado de fluoresceína: Cada vial contiene 1,5 ml de conjugado de IgG antihumano marcado con fluoresceína (cadena pesada y ligera) con contratinciones de rodamina y azul de Evans. El conjugado de fluoresceína es una conjugación de purificación de IgG por cromatografía de afinidad con isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés). Añadir contratinciones de rodamina y de azul de Evans a las máscaras del conjugado de fluorescencia no específica de los cultivos celulares de tejidos. Este componente es un líquido listo para su uso. Almacenar a 2-8° C. El conjugado líquido es estable en estas condiciones de almacenamiento hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

Medios de montaje del cubreobjetos: Cada vial contiene 2,0 ml de glicerol tamponado con fosfato con retardante gradual. Este componente es un líquido listo para su uso. La temperatura de almacenamiento puede variar de refrigerada a temperatura ambiente (2-30° C). Los medios de montaje son estables en cualquier condición de almacenamiento hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

Salina tamponada con fosfato (PBS): Cada paquete aluminizado sellado de tampón en polvo genera un litro de 1X PBS. Las temperaturas de almacenamiento pueden variar de refrigerada a temperatura ambiente (2-30° C). Añadir el contenido completo de un paquete de PBS para un litro de agua destilada o desionizada recién preparada. Nota: Añadir sales mientras que se agita rápidamente el agua facilitará la solubilización. Almacenar el PBS como una solución a 2-8° C.

Papeles secantes especiales: Los papeles absorbentes tienen agujeros precortados para secar la máscara del porta. Las temperaturas de almacenamiento pueden variar de refrigerada a temperatura ambiente (2-30° C).

Precauciones generales

Equipo de prueba IFA: Sin estándar de potencia para EE.UU.

- Almacenar todos los componentes del equipo a las temperaturas recomendadas o sugeridas. **No congelar.**
- No utilice los componentes vencida la fecha de caducidad indicada de cada componente.
- SCIMEDX optimiza todos los componentes activos en cada lote de sus equipos de IFA como una unidad. No mezcle componentes de diferentes lotes o de diferentes fuentes.
- Los controles y el conjugado contienen 0,095 % de azida sódica que, si se permite que se acumule, puede formar compuestos explosivos en el plomo y/o en la tubería de cobre. Lavar minuciosamente los desagües si se utilizan para deshacerse de estos materiales.
- Utilice diferentes puntas de pipeta para cada muestra y reactivo para evitar contaminaciones cruzadas.
- Los reactivos deben ser inspeccionados para buscar evidencias de contaminación bacteriana o fungica

Portas de antígeno: Todas los portas con antígeno por IFA tienen células fijadas que no contienen agentes infecciosos viables. Sin embargo, las buenas prácticas de laboratorio (GLP) requieren un manejo cuidadoso y la eliminación de portas como con cualquier otro agente de laboratorio de riesgo biológico potencial.

- No retirar los portas de su bolsa protectora hasta que estén listas para su uso.
- No reutilizar el sustrato de los portas

Controles humanos: Todos los controles humanos de estos equipos se han probado para el antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) y el anticuerpo frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) mediante métodos de licencia de FDA y se encontró que no eran reactivos. Sin embargo, ningún sistema de prueba puede garantizar la ausencia de estos agentes. Manejar todos los componentes séricos humanos, incluyendo los recibidos en su laboratorio para su análisis, como agentes de riesgo biológico potencial.



Sustancia nociva (Xn)

Advertencia de seguridad para el control y el conjugado:

La concentración de azida sódica en estos componentes está clasificada como nociva y con quedan sujetas a la siguiente frase de riesgo: "Nocivo en caso de ingestión y el contacto con ácidos libera gases muy tóxicos."

Componente	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Consejos de prudencia Prevención: P264 Lavarse ... concienzudamente tras la manipulación. P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
Pictograma		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.
Palabra Clave	ATENCIÓN	
Indicación de Peligro	H319 Provoca irritación ocular grave.	

Recogida, almacenamiento y limitaciones de las muestras

- Separar el suero o plasma recogido de forma aseptica de los eritrocitos y almacenar en congelación (-10° C o inferior) hasta que esté listo para la prueba. Evitar los ciclos de congelación y descongelación.
- Si se desea, almacenar las muestras de suero o plasma líquido fresco entre 2° y 8° C durante un máximo de una semana sin pérdida de actividad del anticuerpo.
- No utilizar muestras excesivamente lipémicas sin deslipidización.
- No utilizar muestras contaminadas.
- Las muestras de suero pareadas para demostrar la seroconversión o incremento significativo de inmunidad deben recogerse en un intervalo de 7-14 días de diferencia, almacenarse, y a continuación analizarse de manera simultánea.

Material adicional necesario

- Tubos de ensayo, compartimentos, pipetas, placas de microvaloración y dispositivos de pipeteo de seguridad para realizar diluciones de muestras
- Incubadora de 37° C
- Cámara húmeda para la incubación de portas.
- Compartimento con soporte de porta y recipiente de tinción para el lavado de portas
- Cubreobjetos: Vidrio de grosor núm. 1 de 22 x 50 mm

Microscopio de fluorescencia: Se utiliza un microscopio de fluorescencia equipado con los siguientes elementos para calibrar los controles y el conjugado:

- Ocular de 10X
- Objetivos de 16X o 40X
- Epi-iluminación con lámpara halógena de 50W
- Filtro de excitación FITC KP490
- Filtro absorbente 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 reactividades de criterio de valoración e intensidades de fluorescencia pueden deberse al tipo y estado de los equipos de fluorescencia utilizados en su laboratorio.

Procedimiento para IFA

- plPara la detección cualitativa de anticuerpos IgG, preparar una dilución para screening 1: 64 de cada muestra en PBS. Preparar todas las diluciones en un volumen mínimo de 0,10 ml con PBS como diluyente.
- Para la valoración cuantitativa de sueros, preparar diluciones dobles en serie de la muestra de suero en PBS, comenzando con una dilución 1: 64, y añadiendo volúmenes iguales de suero o plasma y PBS diluido para cada dilución consecutiva.
- Retirar los portas de la bolsa protectora y aplicar 1 gota (aproximadamente 20 µl) de la(s) muestra(s) de ensayo diluida(s) a cada pocillo. Añadir un volumen suficiente para cubrir completamente cada pocillo, sin mezclar los contenidos entre los pocillos. Nota: La realización diaria de la prueba requiere un pocillo por cada control positivo, control negativo y PBS (control conjugado).
- Incubar los portas en una cámara húmeda durante 30 minutos a 37° C.
- Enjuagar los portas bajo flujo de agua ligero de solución tamponadora. Evitar dirigir el flujo a los pocillos.
- Lavar los portas durante 10 minutos con un cambio de solución de PBS después de 5 minutos. Agitar los portas moviendo el compartimento arriba y abajo en la solución tamponadora.
- Secar la demarcación alrededor de los pocillos de prueba con los papeles secantes especiales.
- Aplicar una gota del conjugado listo para su uso a cada pocillo de ensayo.
- Repetir los pasos 4 (incubación), 5 (enjuague de PBS), 6 (10 minutos de lavado de PBS) y 7 (secado).
- Aplicar los medios de montaje de glicerol y cubreobjetos de vidrio de 22 x 50 mm.
- Observar la reactividad con microscopía de fluorescencia utilizando aumentos de 20-40X. Para obtener los mejores resultados, examinar los portas inmediatamente después de la finalización de la prueba. Para obtener resultados equivalentes, sellar portas o mantener húmeda para minimizar la deshidratación del medio de montaje, almacenar en un lugar oscuro a 2-8° C, y leer un plazo de tres días. La reacción positiva puede variar en intensidad de fluorescencia de brillante a débil. Graduar la reacción de fluorescencia de acuerdo con la siguiente escala de intensidad: 4° (luminoso), 3° (fluorescente), 2° (moderada) y 1° (débil).

Interpretación de los resultados

- La tinción de verde fluorescente de las células infectadas indica una reacción positiva de anticuerpos IgG frente a VHH-8. Para antígeno lítico, toda la célula, tanto citoplasma como el núcleo, será fluorescente. Para proporcionar un control interno, cada pocillo en el portaobjetos de microscopio contiene las células infectadas y no infectadas por VHH-8. Preparación de la porta de esta manera es intencional. Las células no infectadas, teñidas de rojo por la contratinción, proporcionan un fondo de contraste. La infectividad de las células oscila entre el 15-50%. Valoración de VHH-8 positivo El suero IgG proporcionará información cuantitativa. En una serie de valoración, la dilución más alta de suero que demuestra una reacción 1° se interpreta como el criterio de valoración.
- La ausencia de tinción fluorescente específica de las células infectadas indica una reacción negativa de anticuerpos IgG frente a VHH-8.

Significado de la interpretación

1. No se discernió fluorescencia de las células infectadas encontradas en la dilución de screening.	1. La muestra de anticuerpos IgG frente al VHH-8 es negativa.
---	---

2. Fluorescencia positiva específica de las células infectadas encontradas en la dilución de screening o en diluciones mayores.	2. La muestra de anticuerpos IgG frente al VHH-8 es positiva, lo que indica una infección anterior por VHH-8. La seroconversión o un aumento de cuatro veces o más en el valor de anticuerpos IgG en las muestras pareadas de suero indica una infección reciente por VHH-8.
3. Fluorescencia hallada en las células infectadas y en las no infectadas.	3. La muestra indica una reacción no específica.

Nota: El desempeño de la prueba específica para anticuerpos IgM frente al VHH-8 ayuda en el diagnóstico de una infección actual por VHH-8.

Control de calidad

- Para garantizar el funcionamiento adecuado de la prueba, utilizar los controles positivos y negativos al menos una vez para la prueba de cada día.
- El tipo y la antigüedad del microscopio de fluorescencia y las horas de uso de la bombilla UV pueden afectar a la intensidad de la fluorescencia y los criterios de valoración hasta cierto punto. El control positivo de anticuerpo frente a VHH-8 que se suministra con este equipo se encuentra en el vial demuestra una reacción de intensidad de 2° a 4°. El vial tiene una valoración listada para utilizar como un control adicional para el sistema de prueba (ver 1° Nota de dilución). Utilícelo como calibrador para una reacción de intensidad de 2° a 4° en el microscopio.
- Utilice el control negativo de anticuerpo frente a VHH-8 que se suministra con este bit como calibrador para una reacción negativa en su equipo.
- La prueba de cada día debe incluir un pocillo de PBS en lugar de una muestra de prueba. Este es un conjugado de control para garantizar que el conjugado no reacciona con el sustrato de células.

1 Nota de Dilución

El control positivo en este equipo es un líquido listo para su uso que proporciona una reacción de intensidad de 2° a 4° al ser analizado. Para obtener una intensidad de fluorescencia de 1°, hacer diluciones dobles hasta el valor indicado en el vial incluido en este equipo. Valorar el control positivo con el uso inicial del equipo.

El valor que obtenga en la prueba puede diferir de la dilución listada debido a una serie de razones técnicas. Lo mejor es poner a prueba el valor indicado en el vial, así como la dilución doble inmediatamente antes y después de la valoración listada. Es normal que los resultados obtenidos para un criterio de valoración (1°) difieran entre laboratorios debido a factores que afectan a la intensidad de la fluorescencia. Estos factores incluyen:

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

Limitaciones del procedimiento

- Una prueba serológica como la IFA sirve como ayuda para detectar la infección viral, pero su uso no debe ser el único criterio. Los resultados de las pruebas deben utilizarse en conjunción con información disponible del paciente, evaluación clínica y otros procedimientos de diagnóstico disponibles.
- Un resultado individual positivo para anticuerpos IgG frente a VHH-8 es significativo sólo en cuanto que indica contacto previo o infección con el virus. Para fines epidemiológicos un resultado individual es útil. No obstante, no debe utilizarse como una indicación de infección actual o reciente por el virus. Para determinar infección actual o reciente, debe realizarse la prueba simultánea de muestras pareadas de suero o plasma tomadas con 7-14 días de diferencia. Un aumento de cuatro veces o más e la valoración entre la primera y la segunda muestra es indicativo de una infección actual o reciente.
- Las reacciones positivas no específicas, como anticuerpos antinucleares y/o reacciones de anticuerpos anticitoplasmáticos pueden producirse en muestras de pacientes con ciertas enfermedades autoinmunes. Las células infectadas y no infectadas presentarán fluorescencia, lo que puede ocultar una reacción positiva al VHH-8. Por lo tanto, la observación de una reacción autoinmune no puede eliminar la posibilidad de infección por VHH-8. La comparación con el control positivo, con su reacción particulares, o las pruebas de la muestra con una prueba específica para AAN podría ser útil para eliminar falsos positivos.

Valores esperados

Cuando se utilizan test de anticuerpos líticos y latentes, casi todos los pacientes con SK y aproximadamente el 90 % de hombres homosexuales infectados por el VIH muestran anticuerpos frente a VHH-8. Diferentes pruebas serológicas, entre las que se incluyen IFA, ELISA y análisis de inmunotransferencia, han demostrado diferentes tasas de prevalencia para anticuerpos contra el virus VHH-8 en la población adulta normal, desde un mínimo de 4 % al 25 %. Debido a los diferentes niveles de sensibilidad y especificidad de los diversos inmunanálisis, se requerirán más pruebas con la normalización de sistemas de detección para aclarar las tasas de prevalencia. La seropositividad no es común antes de la pubertad.

Características de rendimiento

Sensibilidad relativa y especificidad: Este equipo se comparó con un equipo ORF 65 de ELISA para VHH-8 con objeto de determinar la sensibilidad y especificidad entre las dos pruebas. El estudio evaluó 311 muestras de suero humano que consistían en muestras de pacientes con sarcoma de Kaposi, virus del herpes humano tipo 6 y mielomas múltiples.

Los datos se resumen en la tabla siguiente.

IFA de SCIMEDX

ELISA alternativo	Muestras	VHH-8 Estado lítico	Reactivo	No reactivo	Total
	Sarcoma de Kaposi	Reactivo	102	0	102
		No reactivo	0	0	
	Donantes de sangre	Reactivo	0	1	194
		No reactivo	5	188	
	Mielomas múltiples	Reactivo	0	0	10
		No reactivo	0	10	
	HHV6 Positivo	Reactivo	0	0	5
		No reactivo	0	5	
	Total		107	204	311

Diagnóstico serológico: =305/311 = 98,1%

Reproducibilidad: Se realizaron diluciones dobles en serie de seis muestras seropositivas con diversas valoraciones (1: 64 a 1: 2048) y se analizó una muestra seronegativa tres veces cada una en dos días diferentes y se determinó el criterio de valoración. Los veintinueve criterios de valoración estaban dentro de las especificaciones de más o menos una dilución doble.

Valor idéntico 18/21
± uno, dilución doble 3/21

Especificidad del VHH-8: La prueba IFA para el VHH-8 lítico es una prueba específica para la detección de anticuerpos frente a VHH-8. Treinta y uno de treinta y cinco seropositivos para el anticuerpo IgG a cualquier citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (VEB), virus del herpes humano tipo 1 (HSV1), virus del herpes humano tipo 6 (HHV6), o el virus de la varicela zoster (VZV), o cualquier combinación de estos virus, dio un resultado negativo para anticuerpos IgG frente a VHH-8 con esta prueba IFA. La siguiente tabla resume los datos.

Datos de reactividad cruzada IgG frente a VHH-8 de SCIMEDX

Tipo de enfermedad	Muestras totales	Resultado positivo
CMV	6	3/6
EBV	21	0/21
HSV1	1	0/1
HHV6	6	1/6
VZV	1	0/1
Total	35	4/35

Estabilidad en tiempo real: Las pruebas de estabilidad en tiempo real de los componentes del equipo se llevó a cabo a intervalos de 6 meses durante un mínimo de 24 meses. Los criterios de valoración de los controles positivos y negativos se compararon con los criterios de valoración en el comienzo. Los criterios de aceptación son los criterios de valoración dentro de una dilución doble de cada uno. Estos resultados estaban dentro de las especificaciones. Consulte la tabla siguiente.

Estabilidad en tiempo real

Lote de placa	Control	Criterio de valoración en el	Criterio de valoración a
#1	Positivo	1:512	1:256
	Negativo	—	—
#2	Positivo	1:512	1:512
	Negativo	—	—
#3	Positivo	1:512	1:256
	Negativo	—	—

Literature Cited

- Chang, Y., E. Cesarman, M.S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D.M. Knowles, and P.S. Moore. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **265**: 1865-1869.
- Levy, J.A. 1997. Three new human herpesviruses (HHV6, 7 and 8). *Lancet* **349**: 558-562.
- Beral, V. 1996. Epidemiology of Kaposi's sarcoma, in *Cancer Surveys*, vol. 10: Cancer, HIV, and AIDS (Beral, V., Jaffe, H.W., Weiss, R., eds) pp5-22. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Ganem, D. 1996. Human herpesvirus 8 and the biology of Kaposi's sarcoma. *Virology* **7**: 325-332.
- Luppi, M., and G. Torelli. 1996. The new lymphotropic herpesviruses (HHV-6, HHV-7, HHV8) and Hepatitis C virus (HCV) in human lymphoproliferative diseases: an overview. *Haematologica* **81**: 265-281.
- Kim, S., S.H. Kang, J. Moon, M.S. Kim, Y.S. Kim, K. Park. 1998. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* **30**: 3165.
- Miller, G. M. Rigsby, L. Heston, E. Grogan, R. Sun, C. Metroka, J. Levy, S.-J. Gao, Y. Chang, P. Moore. 1995. Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *New Engl J Med* **334**: 1291-1297.
- Lenette, E.T., D.J. Blackburn, and J.A. Levy. 1996. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* **348**: 858866.
- Blackburn, D.J., J. Ambrozzi, E. Lenette, M. Adams, B. Ramachandran, and J.A. Levy. 1997. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor. *Lancet* **349**: 609-611.
- Simpson, G.R., T.F. Schultz, D. Whitby, P.M. Cook, C. Boshoff, L. Rainbow, M.R. Howard, S.Gao, R.A. Bozhanky, P. Simmonds, C. Lee, A. de Ruiter, A. Hatzakis, R.S. Tedder, I.V.D. Weller, R.A. Weiss, and P.S. Moore. 1996. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* **348**: 1133-38.
- Kedes, D.H., D. Ganem, N. Ameli, P. Baccetti, and R. Greenblatt. 1997. The prevalence of serum antibody to human herpesvirus 8 (sarcoma de Kaposi asociado Herpesvirus) among HIV-seropositive and high-risk HIV- seronegative women. *JAMA* **277**: 478-481.
- Kedes, D.H., E. Operskalski, M. Busch, K. Kohn, J. Flood, D. Ganem. 1996. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Med.* **2**: 918-921.
- Martin, J.N., D.E. Ganem, D.H. Osmond, K.A. Page-Shafer, D. Macrae, and D.H. Kedes. 1998. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *New Engl. J. Med.* **338**: 948-54.
- Chatlynne, L.G., W. Lapps, M. Handy, Y.Q. Huang, R. Masood, A.S. Hamilton, J.W. Said, H.P. Koeffler, M.H. Kaplan, A. Friedman-Kien, P.S. Gill, J.E. Whitman, and D.V. Ablashi. 1998. Detection and titration of human herpesvirus-8 specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* **92**: 53-58.

SCIMEDX CORPORATION
53 Hightboynton 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



ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA INDIRECTA PARA HERPESVIRUS 8 HUMANO ANTICORPO (HHV8) IgG LÍTICO

Somente para exportação

Somente para utilização em diagnóstico in vitro.

I-HV802G	120 Tests
I-HV804G	40 Tests

Utilização

O ensaio de fluorescência Indirecta (IFA) da SCIMEDX para anticorpos IgG para o antígeno humano Herpesvirus 8 (HHV8 Lítico) destina-se à detecção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos IgG (Imunoglobulina G) para antígenos HHV8 líticos em soro ou plasma humano. A detecção de anticorpos IgG HHV8 no humano pode ser utilizada como auxiliar no diagnóstico de infecção primária ou reactivação/reinfecção com este vírus, ou pode ser evidência de infecção HHV8 prévia.

Introdução e Sumário do Procedimento

O herpesvirus humano 8 (HHV8), também conhecido como Herpesvirus do Sarcoma de Kaposi (KSHV), foi identificado em 1994 por Chang em lesões KS. Foram descobertas sequências de DNA únicas muito semelhantes a regiões do Herpesvirus saimiri e vírus Epstein Barr que existem em todas as formas de sarcoma de Kaposi independentemente do KS estar associado ao vírus de imunodeficiência humana (VIH) ou não. O KS clássico é uma doença rara que ocorre em homens mediterrânicos idosos. Em doentes com o síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) o KS é o neoplasma mais frequente. O KS também tem sido observado em receptores de transplantes e em certas populações africanas. Adicionalmente o HHV8 tem sido associado com linfomas das cavidades corporais, também chamados linfoma de efusão primário, doença de Castleman multi-centrica, linfoma non-Hodgkin e mieloma múltiplo (1-6).

O HHV8 é agora classificado como herpesvirus gamma, do género Rhadinovirus, e assemelha-se ao EBV no seu tropismo para as células B e capacidade de existir no estado latente. Apesar das culturas de células estabelecidas de linfomas das cavidades corporais estarem frequentemente co-infectadas com HHV8 e EBV, algumas culturas são EBV negativas. Se as culturas de células estiverem latentemente infectadas com HHV8 podem ser quimicamente induzidas a produzir vírus activamente replicante. Assim, estas linhas HHV8, não infectadas com EBV, tornaram possíveis estudos serológicos para detectar anticorpos para diferentes proteínas virais, incluindo antígenos latentes, especialmente antígenos nucleares associados a latência (LANA), e antígenos líticos expressos por vírus replicantes (7-8).

Os estudos serológicos mostraram que a infecção por HHV8 precede o desenvolvimento tumoral de KS clínico. Estudos sugerem que o HHV8 é transmitido sexualmente e indicam que a infecção viral HHV8 não é tão comum na população geral como outros herpesvirus. Diferentes testes serológicos mostram taxas de prevalência variáveis para anticorpos HHV8 na população adulta normal, de 4% a 25%. Permanecem ainda por estabelecer determinações mais rigorosas das taxas de prevalência com a utilização de uma combinação de testes que meçam anticorpos para antígenos líticos e latentes e estandardização dos sistemas teste. Quando se utilizam testes para anticorpos líticos e latentes quase todos os doentes KS e ~90% de homens homossexuais infectados com VIH apresentam anticorpos para HHV8 (9-14).

Entre os ensaios serológicos, o IFA mostrou ser um método prático e rigoroso para a detecção e semi-quantificação de anticorpos IgG para HHV8. Devido à necessidade de detectar ambos os anticorpos líticos e latentes a SCIMEDX Tem dois ensaio de fluorescência indirecta para a determinação de anticorpos HHV8, com dois tipos de lâminas para a detecção diferencial de anticorpos para antígenos líticos e latentes.

Princípio do teste

Os ensaios de anticorpos fluorescentes da SCIMEDX utilizam o método indirecto de detecção de anticorpos e determinação de título. As amostras de soro ou plasma do doente são aplicadas a células cultivadas contendo antígenos virais inactivados fornecidos em poços delineados em lâminas de vidro de microscópio. Durante uma incubação de 30 minutos, os anticorpos específicos para antígenos HHV8 formam um complexo antígeno/anticorpo com os antígenos HHV8 nas células infectadas. No passo de lavagem são eliminados os anticorpos não específicos e outras proteínas séricas não reactivas. Aplica-se então aos poços uma IgG de cabra anti-humana conjugada a fluoresceína. O conjugado anti-IgG combina com IgG humana, se presente, durante uma incubação de 30 minutos. Após uma breve lavagem para remover o conjugado não reactivo, as lâminas são observadas num microscópio de fluorescência. Uma reacção positiva apresenta uma fluorescência verde brilhante no local do antígeno.

Material Fornecido e Condições de Armazenamento

Lâminas de antígeno HHV8: Lâminas de linfócitos humanos a expressar antígenos HHV8 líticos em cada poço. As lâminas estão prontas a usar após serem retiradas da embalagem de protecção. Armazenar a 2-8°C. As lâminas são estáveis nestas condições até à data de validade marcada no rótulo da embalagem.

Controlo Positivo HHV8 IgG: Cada frasco contém 0.5 ml de controlo humano positivo para anticorpos IgG HHV8. Este componente está pronto a usar líquido. Armazenar a 2-8°C. O controlo positivo líquido é estável nestas condições até à data de validade marcada no rótulo do frasco.

Controlo Negativo HHV8 IgG: Cada frasco contém 0.5 ml de controlo humano negativo para anticorpos IgG HHV8. Este componente está pronto a usar líquido. Armazenar a 2-8°C. O controlo negativo líquido é estável nestas condições até à data de validade marcada no rótulo do frasco.

Conjugado de Fluoresceína: Cada frasco contém 1,5ml de IgG (cadeias leves e pesadas) anti-humana de cabra (inactivada) conjugada a fluoresceína com Evans Blue e Rodamina. O conjugado de fluoresceína é uma conjugação de IgG anti-humana purificada por cromatografia de afinidade com isocianato de fluoresceína (FITC). A adição de Evans Blue e Rodamina ao conjugado obvia a fluorescência não específica das células de cultura de tecido. Este componente está pronto a usar líquido. Armazenar a 2-8°C. O conjugado líquido é estável nestas condições até à data de validade marcada no rótulo do frasco.

Meio de Montagem: Cada frasco contém 2.0 ml de glicerol tamponado com retardador de perda de sal. Este componente está pronto a usar líquido. A temperatura de armazenamento pode variar de frio a temperatura ambiente (2-30°C). O meio de montagem é estável nestas condições até à data de validade marcada no rótulo do frasco.

Tampão Fosfato Salino (PBS): Cada embalagem selada de tampão em pó perfaz um litro de 1X PBS. A temperatura de armazenamento pode variar de frio a temperatura ambiente (2-30°C). Adicionar todo o conteúdo de uma embalagem de PBS a um litro de água destilada ou desionizada preparada de fresco. Nota: Mexer a água enquanto se adicionam os sais facilita a solubilização. Armazenar o PBS como solução a 2-8°C.

Blotters Especiais: Os blotters absorventes têm orifícios pré-cortados para utilizar na secagem da lâmina. A temperatura de armazenamento pode variar de frio a temperatura ambiente (2-30°C).

Precações Gerais

IFA Test Kit: No US Standard of Potency.

- Armazenar todos os componentes do kit às temperaturas recomendadas ou sugeridas. **Não congelar.**
- Não utilizar os componentes para além das datas de validade correspondentes.
- 1. A SCIMEDX optimiza todos os componentes activos de cada lote dos seus kits IFA como uma unidade. Não misturar componentes de lotes diferentes ou de origem diferente.

2. Os controlos e conjugado contêm 0.095% de azida sódica que, se acumulada, pode formar compostos explosivos nas canalizações. Passar por água abundante ao eliminar estes materiais.
3. Use as pontas de pipeta separada para cada amostra e reagente para evitar a contaminação cruzada.
4. Os reagentes devem ser inspecionados quanto à evidência de contaminação bacteriana ou fúngica.

Antigen slides: Todas as lâminas IFA de antígeno têm células fixadas que não contêm quaisquer agentes infecciosos viáveis. Contudo, as boas práticas de laboratório (GLP) exigem um manuseamento cuidadoso como com qualquer outro material de laboratório potencialmente perigoso.

1. Não retirar as lâminas das suas embalagens antes de usar.
2. Não reutilize slides

Human Controls: Os controlos humanos destes kits foram testados para antígeno de superfície da Hepatite B (HbsAg) e vírus da imunodeficiência humana (VIH) por métodos licenciados pela FDA e dados como não reactivos. Contudo, nenhum teste pode assegurar a ausência destes agentes. Manipular todos os componentes séricos humanos, incluindo os recebidos no laboratório para teste, como potencialmente perigosos.

☒ Xn-Substância Nociva

Precaução de segurança para controlos e conjugado:

A concentração de azida sódica nestes componentes é classificada como Nociva e sujeita à seguinte frase de risco: "Nociva se engolida e em contacto com ácidos liberta gás muito tóxico"

Componente	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Recomendação de prudência Prevenção: P264 Lavar ... cuidadosamente após manuseamento.
Pictograma		P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
Signal Word	AVISO	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.
Advertência de Perigo	H319 Provoca irritação ocular grave.	P337+P313 Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

Colheita da Amostra, Armazenamento e Limitações das Amostras

1. Separar o soro ou plasma colhido assepticamente dos globules vermelhos e congelar (-10°C ou menos) até testar. Evitar ciclos repetidos de congelamento/descongelamento.
2. Se desejado, armazenar as amostras frescas a 2° - 8°C até uma semana sem perda da actividade do anticorpo.
3. Não usar amostras excessivamente lipémicas sem deslipemização.
4. Não usar amostras contaminadas.
5. Os pares de amostras para demonstração da serconversão ou aumento significativo de título devem ser colhidas com um intervalo de 7-14 dias, armazenadas, e testadas em simultâneo.

Material Adicional Necessário

1. Tubos teste, suportes, pipetas, placas de microtitulação e dispositivos de pipetagem para as diluições das amostras
 2. Incubadora de 37°C
 3. Câmara húmida para incubação das lâminas
 4. Suporte de laminas e recipiente para lavagem de lâminas
 5. Lamelas: 22 X 50 mm espessura do vidro No. 1
- Microscópio de fluorescência: Para calibrar os controlos e conjugado foi utilizado um microscópio de fluorescência equipado com o seguinte:
- Ocular 10X
 - Objectives 16X ou 40X
 - Epiluminador com lâmpada de halogénio 50W
 - Filtro de excitação FITC KP490
 - Filtro de absorção amarelo K530
 - Filtro de supressão vermelho BG38

A fluoresceína tem um pico de excitação a 490 nm e um pico de emissão a 520 nm. O tipo e estado do equipamento de fluorescência usado no laboratório podem causar diferenças na reactividade e intensidade de fluorescência

Procedimento IFA

1. Para a determinação qualitativa de anticorpos IgG, preparar uma diluição de despiste de 1:64 em PBS para cada amostra. Preparar todas as diluições num volume mínimo de 0.10ml com PBS como diluente.
2. Para a titulação quantitativa dos soros, preparar uma diluição seriada da amostra em PBS, partindo da diluição 1:64 e adicionando igual volume de soro ou plasma diluído e PBS para cada diluição consecutiva.
3. Retirar as lâminas das suas embalagens e aplicar 1 gota (cerca de 20 µl) de amostra(s) diluída(s) a cada poço. Adicionar suficiente volume para cobrir completamente cada poço, evitando a mistura do conteúdo entre os poços. Nota: Cada dia de ensaio requer um poço para o controlo positivo, controlo negativo e PBS (controlo do conjugado).
4. Incubar as lâminas em câmara húmida durante 30 minutos a 37°C.
5. Enxaguar as lâminas com uma leve corrente de tampão. Evitar dirigir o fluxo directamente para os poços.
6. Lavar as lâminas durante 10 minutos com uma muda de PBS após 5 minutos. Agitar as lâminas movendo o suporte no PBS.
7. Absorver a superfície que envolve os poços com os blotters especiais.
8. Aplicar uma gota de conjugado pronto a usar a cada poço.
9. Repetir os passos 4 (incubação), 5 (enxaguamento com PBS), 6 (10 minutos de lavagem em PBS), e 7 (blot).
10. Aplicar o meio de montagem e a lamela de vidro 22 X 50 mm
11. Observar a reactividade ao microscópio de fluorescência com uma magnificação de 20-40X. Para melhores resultados, examinar as lâminas imediatamente após o término do teste. Para obtenção de resultados equivalentes selar as lâminas ou mantê-las húmidas para minimizar a desidratação do meio de montagem, armazenar no escuro a 2-8°C, e ler em três dias. A reactividade positiva pode variar na intensidade da fluorescência de brilhante a fraca. Classificar a reacção de fluorescência de acordo com a seguinte escala de intensidade: 4° (brilhante), 3° (clara), 2° (moderada) e 1° (fraca).

Interpretação dos Resultados

- Uma marcação verde-fluorescente brilhante das células infectadas mostra uma reacção positiva para anticorpos IgG HHV8. Para o antígeno lítico observa-se fluorescência em toda a célula, quer no citoplasma quer no núcleo. Como controlo interno, cada poço na lâmina contém células infectadas e não infectadas. A preparação da lâmina desta forma é intencional. As células não infectadas, coradas de vermelho, fornecem um fundo contrastante. IA infecciosidade das células varia entre 15-50%. A titulação dos soros IgG HHV8 positivos dará informação quantitativa. Na série de titulações, a maior diluição de soro a demonstrar uma reacção 1° é interpretada como o título final.
- A ausência de marcação fluorescente específica das células infectadas mostra uma reacção negativa para anticorpos IgG HHV8.

Significado da Interpretação

1. Ausência de fluorescência visível nas células infectadas à diluição de despiste	1. A amostra é negativa para anticorpos IgG HHV8
2. Fluorescência positiva específica das células infectadas à diluição de despiste ou diluições superiores.	2. Amostra é positiva para anticorpos IgG HHV8, indicando infecção HHV8 prévia. Seroconversão ou um aumento de 4x ou mais no título de anticorpos IgG em pares de amostras indica infecção HHV8 recente.
3. Fluorescência nas células infectadas e células não infectadas.	3. A amostra apresenta reação não específica.

Nota: Efectuar um teste específico para anticorpos IgM HHV8 auxilia no diagnóstico de uma infecção HHV8 actual.

Controlo de Qualidade

- Para assegurar que o teste está a funcionar correctamente, usar os controlos positivo e negativo pelo menos uma vez em cada dia de testes.
- O tipo e antiguidade do microscópio de fluorescência e horas de utilização da lâmpada UV pode afectar, até certo grau, a intensidade da fluorescência e títulos finais. O controlo positivo HHV8 fornecido no kit mostra uma intensidade de reação de 2⁺ a 4⁺. O frasco tem um título listado para usar como uma verificação adicional para o teste (ver Nota de Diluição 1⁺). Utilizá-lo como o calibrador para uma intensidade de reação de 2⁺ a 4⁺ no microscópio do laboratório.
- Usar o controlo negativo HHV8 fornecido no kit para uma reação negativa no equipamento do laboratório.
- Em cada dia de teste deve-se incluir um poço de PBS no lugar de uma amostra. Este serve como controlo do conjugado de forma a assegurar que o conjugado não está a reagir com o substrato celular.

Nota de Diluição 1⁺

O controlo positivo deste kit está pronto a usar líquido que apresenta uma intensidade de fluorescência de 2⁺ a 4⁺ quando testado. Para obter uma intensidade de fluorescência de 1⁺, fazer diluições seriadas ao título indicado no frasco incluído no kit. Titular o controlo positivo no início de utilização do kit. O título obtido no teste pode diferir da diluição listada devido a uma série de razões técnicas. É melhor testar o título indicado no frasco, bem como as diluições imediatamente antes e depois do título listado. É normal que os resultados obtidos de um título final (1⁺) difiram entre laboratórios devido a factores que afectam a intensidade da fluorescência. Estes factores incluem:

- a potência da fonte de luz UV no microscópio
- tipo de fonte de luz
- idade da lâmpada
- extensão do padrão óptico de microscópio e os tipos de filtros ópticos usados
- rigor das técnicas de diluição e do equipamento de diluição

Limitações do Procedimento

- Um teste serológico como um IFA serve como auxiliar na detecção de infecção viral mas a sua utilização não deve ser o único critério. Os resultados do teste devem ser usados em conjunto com informação disponível sobre o doente, avaliação clínica e outros procedimentos de diagnóstico disponíveis.
- Um único resultado positivo para anticorpos IgG HHV8 significa apenas uma indicação de contacto prévio ou infecção com o vírus. Para fins epidemiológicos um único resultado é útil. Contudo, não deve ser usado como uma indicação de infecção actual ou recente com o vírus. Para determinar uma infecção actual ou recente, deve ser feito um teste simultâneo com pares de amostras de soro ou plasma colhidos com 7-14 dias de intervalo. Um aumento de título superior ou igual a quatro vezes entre a primeira e segunda amostra é indicativo de uma infecção actual ou recente.
- Em amostras de doentes com certas doenças autoimunes podem ocorrer reações positivas não específicas como reações de anticorpos antinucleares e/ou anticitoplasmáticos. Quer as células infectadas quer as não infectadas vão apresentar fluorescência o que pode obscurecer uma reação HHV8 positiva. Assim, a observação de uma reação autoimune não pode eliminar a possibilidade de uma infecção HHV8. A comparação com o controlo positivo ou testar a amostra num teste específico para ANAs pode ser útil para eliminar falsos positivos.

Valores Esperados

Quando são utilizados ambos os testes para anticorpos latentes e líticos, quase todos os doentes KS e cerca de 90% dos homens homossexuais infectados com VIH apresentam anticorpos para HHV8. Teste serológicos diferentes, incluindo IFA, ELISA e imunoblot, mostraram taxas de prevalência variáveis para anticorpos HHV8 na população adulta normal- de 4% a 25%. Devido às diferenças sensibilidade e especificidades dos vários imunoenaios são necessários mais testes com a estandarização dos sistemas de detecção para clarificar as taxas de prevalência. A seropositividade não é comum antes da puberdade.

Características de Performance

Sensibilidade e Especificidade Relativas: Este kit foi comparado com um ELISA ORF 65 para determinar a sensibilidade e especificidade entre os dois testes. O estudo testou 311 amostras séricas que consistiam de amostras de doentes com sarcoma de Kaposi, Herpes Virus Humano 6 e mielomas múltiplos. Também foram incluídos soros de dadores de sangue normais. Os dados estão sumariados na seguinte tabela.

SCIMEDX IFA						
ELISA	Amostras	Estado Lítico	HHV8	Reactivo	Não-reactivo	Total
	Sarcoma de Kaposi	Reactivo		102	0	102
		Não-reactivo		0	0	
	Dadores de sangue	Reactivo		0	1	194
		Não-reactivo		5	188	
	Mielomas múltiplos	Reactivo		0	0	10
		Não-reactivo		0	10	
	HHV6 Positivo	Reactivo		0	0	5
		Não-reactivo		0	5	
	Total				107	204

Concordância serológica = 305/311 = 98.1%

Reprodutibilidade: Foram feitas diluições seriadas em seis amostras seropositivas com vários títulos (1:64 to 1:2048) e uma amostra seronegativa e testadas três vezes em dois dias diferentes ao título final determinado. Todos os vinte e um títulos finais estiveram dentro da especificação de mais ou menos uma diluição seriada

Título identiol 18/21
± um, diluição seriada 3/21

Especificidade HHV8: O teste IFA para HHV8-Lítico é um teste específico para detecção de anticorpos para HHV8. Trinta e um de trinta e cinco soros positivos para anticorpos IgG para citomegalovírus (CMV), vírus Epstein-Barr (EBV), vírus herpes humano 1 (HSV1) ou vírus varicela zoster (VZV), ou qualquer combinação destes vírus, foram negativos para anticorpos IgG HHV8 com este teste IFA. A tabela seguinte sumaria os dados.

Recatividade Cruzada-SCIMEDX HHV8 IgG

Doença	Total Amostras	Resultado Positivo
CMV	6	3/6
EBV	21	0/21
HSV1	1	0/1
HHV6	6	1/6
VZV	1	0/1
Total	35	4/35

Estabilidade em Tempo Real: O teste de estabilidade em tempo real dos componentes do kit foi feito em intervalos de 6 meses num mínimo de 24 meses. Os títulos finais dos controlos positivo e negativo foram comparados com os títulos finais na altura da libertação do lote. O critério de aceitação são títulos finais dentro de duas diluições seriadas de cada. Estes resultados estiveram dentro das especificações. Reportar à seguinte tabela.

Real Time Stability

Lote da lâmina	Controlo	Título Final libertação	Título Final aos 24 meses
#1	Positivo	1:512	1:256
	Negativo	-	-
#2	Positivo	1:512	1:512
	Negativo	-	-
#3	Positivo	1:512	1:256
	Negativo	-	-

Literatura Citada

- Chang, Y., E. Cesarman, M.S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D.M. Knowles, and P.S. Moore. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **265**: 1865-1869.
- Levy, J.A. 1997. Three new human herpesviruses (HHV6, 7 and 8). *Lancet* **349**: 558-562.
- Beral, V. 1996. Epidemiology of Kaposi's sarcoma, in *Cancer Surveys*, vol. 10: Cancer, HIV, and AIDS (Beral, V., Jaffe, H.W., Weiss, R., eds) pp5-22. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Ganem, D. 1996. Human herpesvirus 8 and the biology of Kaposi's sarcoma. *Virology* **7**: 325-332.
- Luppi, M., and G. Torelli. 1996. The new lymphotropic herpesviruses (HHV-6, HHV-7, HHV8) and Hepatitis C Virus (HCV) in human lymphoproliferative diseases: an overview. *Haematologica* **81**: 265-281.
- Kim, S., S.H. Kang, J. Moon, M.S. Kim, Y.S. Kim, K. Park. 1998. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* **30**: 3165.
- Miller, G. M. Rigsby, L. Heston, E. Grogan, R. Sun, C. Metroka, J. Levy, S.-J. Gao, Y. Chang, P. Moore. 1995. Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *New Engl J Med* **334**: 1291-1297.
- Lenette, E.T., D.J. Blackbourn, and J.A. Levy. 1996. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* **348**: 858866.
- Blackbourn, D.J., J. Ambrozziak, E. Lenette, M. Adams, B. Ramachandran, and J.A. Levy. 1997. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor. *Lancet* **349**: 609-611.
- Simpson, G.R., T.F. Schultz, D. Whitby, P.M. Cook, C. Boshoff, L. Rainbow, M.R. Howard, S.Gao, R.A. Bohenzky, P. Simmonds, C. Lee, A. de Ruiter, A. Hatzakis, R.S. Tedder, I.V.D. Weller, R.A. Weiss, and P.S. Moore. 1996. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* **349**: 1133-38.
- Kedes, D.H., D. Ganem, N. Ameli, P. Baccetti, and R. Greenblatt. 1997. The prevalence of serum antibody to human herpesvirus 8 (Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus) among HIV-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. *JAMA* **277**: 478-481.
- Kedes, D.H., E. Operskalski, M. Busch, K. Kohn, J. Flood, D. Ganem. 1996. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Med.* **2**: 918-921.
- Martin, J.N., D.Ee. Ganem, D.H. Osmond, K.A. Page-Shafer, D. Macrae, and D.H. Kedes. 1998. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *New Engl. J Med.* **338**: 948-54.
- Chatlynne, L.G., W. Lapps, M. Handy, Y.Q. Huang, R. Masood, A.S. Hamilton, J.W. Said, H.P. Koeffler, M.H. Kaplan, A. Friedman-Kien, P.S. Gill, J.E. Whitman, and D.V. Ablashi. 1998. Detection and titration of human herpesvirus-8 specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* **92**: 53-58.

SCIMEDX CORPORATION
53 Hightboynton 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
----	-----	---



NEPŘÍMÉ FLUORESCENČNÍ STANOVENÍ PROTILÁTEK IgG PROTI LIDSKÉMU HERPESVIRU 8 (HHV8 LYTIC)

POUZE PRO EXPORT

I-HV802G 120 testů
I-HV804G 40 testů

Účel použití

SCIMEDX Indirect Fluorescence Assay (IFA) na protilátky IgG proti lytickým antigenům HHV8 (Human Herpesvirus 8 Antigen) je určen pro kvalitativní a semikvantitativní detekci IgG (Immunoglobulin G) protilátek proti HHV8 lytickým antigenům v lidském séru nebo plazmě.

Detekci IgG protilátek proti HHV8 u člověka lze použít jako pomůcku při diagnostice primární infekce nebo reaktive/reinfekce tímto virem, nebo může poskytnout informaci o proběhlé infekci HHV8.

Úvod a shrnutí postupu testu

Lidský herpesvirus 8 (HHV8), také známý jako herpesvirus Kaposiho sarkomu (KSHV), byl identifikován v roce 1994 Changem z lézi KS. Bylo zjištěno, že unikátní sekvence DNA, které jsou blízké regionům Herpesvirusu salmوني a Epstein-Barr viru, existují u všech forem Kaposiho sarkomu po celém světě, ať už je KS spojen s infekcí HIV nebo ne. Klasický KS je vzácná malignance, která se objevuje u starých mužů ve Středomoří. U pacientů s AIDS je KS nejčastějším novotvarem. KS byl také pozorován u příjemců transplantátů u určité populace v Africe. Navíc byl také HHV8 spojen s lymfomy tělních dutin, tzv. primárními euzními lymfomy, multicentrickou Castlemanovu chorobou, non-Hodgkinovým lymfomem a mnohočetným myelomem (1-6).

HHV8 je nyní klasifikován jako gamma herpesvirus, rod Rhadinovirus, a podobá se EBV ve svém tropismu k B-buňkám a schopnosti existovat v latentním stavu. Ačkoli jsou kultury z lymfomů tělních dutin často koinfikovány HHV8 a EBV, některé kultury jsou EBV negativní. Pokud jsou buněčné kultury latentně infikovány HHV8, může být chemicky indukovaná produkce aktivně se replikujícího viru. Tudíž tyto HHV8 non-EBV infikované linie jsou při sérologické studii schopné detekce protilátek proti různým virovým proteinům, včetně latentních antigenů, zvláště LANA (latency-associated nuclear antigens), a lytických antigenů vylučovaných replikujícím se virem (7-8).

Sérologické studie ukázaly, že infekce HHV8 předchází rozvoji nádoru klinického KS. Studie naznačují, že je HHV8 sexuální přenosný, a také ukazují, že není virová infekce HHV8 tak běžná v obecné populaci jako ostatní herpesviry. Různé sérologické testy ukázaly různou míru proměnlivosti u protilátek HHV8 u normální dospělé populace, od 4% do 25%. Přesnější stanovení míry proměnlivosti je založeno na použití kombinace testů protilátek jak proti lytickým, tak i latentním antigenům, a na standardizačních testovacích systémech. Pokud se použije žestování obou, lytických a latentních protilátek, vykazují téměř všichni pacienti s KS a ~90% HIV infikovaných homosexuálních mužů protilátky proti HHV8 (9-14).

Mezi sérologickými stanoveními se ukazuje IFA jako praktická a přesná metoda detekce a semikvantifikace protilátek IgG proti HHV8. Vzhledem k potřebě detekovat protilátky proti lytickým a latentním antigenům, má SCIMEDX dvě nepřímá fluorescenční stanovení pro zjištění protilátek HHV8, se dvěma druhy sklíček pro diferenciální detekci protilátek proti lytickým a latentním antigenům.

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 sklíčka pro mikroskopii. Během 30 minutové inkubace vytvoří protilátky specifické pro HHV8 antigeny komplex antigen/protilátka s antigeny HHV8 v infikovaných buňkách. Krátkým promytím se odstraní nespecifické protilátky a ostatní nezreagované proteiny séra. Pak se do jamek na sklíčko aplikuje fluoresceinem-konjugované kozi protilidské IgG. Anti-IgG konjugát se spojí s lidským IgG, pokud je přítomno, během 30 minutové inkubace. Po krátkém promytí na odstranění nezreagovaného konjugátu se sklíčko prohlíží ve fluorescenčním mikroskopu. Pozitivní reakce protilátek je označena jako světle zelená fluorescence na místech antigenů.

Dodané materiály a podmínky uchovávání

HHV8 antigenová sklíčka: Sklíčka s lidskými lymfocyty uvolňujícími HHV8 lytické antigeny v každé jamce. Sklíčka jsou určena k použití přímo po vyjmutí z obalu. Uchovávejte při 2-8°C. Sklíčka jsou stabilní za těchto podmínek uchování od data expirace na obalu.

HHV8 IgG Pozitivní kontrola: Každá lahvička obsahuje 0.5 ml pozitivní kontroly na lidské protilátky HHV8 IgG. Tato složka je tekutina k přímému použití. Uchovejte při 2-8°C. Tekutá pozitivní kontrola je stabilní za těchto podmínek uchování od data expirace na štítku.

HHV8 IgG Negativní kontrola: Každá lahvička obsahuje 0.5 ml negativní kontroly na lidské protilátky HHV8 IgG. Tato složka je tekutina k přímému použití. Uchovejte při 2-8°C. Tekutá pozitivní kontrola je stabilní za těchto podmínek uchování od data expirace na štítku.

Fluoresceinový konjugát: Každá lahvička obsahuje 1.5 ml fluoresceinem konjugovaných kožic (inaktivovaných) protilidských IgG (těžké a lehké řetězce) s barvivu Evansova modř a Rhodamin. Konjugát fluoresceinu je konjugace afinitní chromatografií purifikovaného protilidského IgG s fluoresceinem izothiocyanátem (FITC). Přidání Evansovy modř 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 od data expirace na štítku.

Montovací médium na krycí sklíčko: Každá lahvička obsahuje 2.0 ml fosfátového pufovaného 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 od 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 čerstvě 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 sklíčka. Teplota uchování může být od chladu až po pokojovou teplotu (2-30°C).

Obecné pokyny

IFA Test Kit: Není 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 expozitivní 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 plísními.

Antigenová sklíčka: Všechna IFA antigenní sklíčka mají fixované buňky, které neobsahují žádné životaschopné infekční agens. Nicméně, správná laboratorní praxe (GLP) vyžaduje opatrné nakládání se sklíčky a jejich likvidaci jako u ostatního potenciálně biologicky nebezpečného laboratorního materiálu.

- Až do použití nevystavujte sklíčka z jejich ochranného obalu.
- Substrátové sklíčko znovu nepoužívejte.

Lidské protilátky: 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:

Koncentrace 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.
Piktogram		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.
Signální slovo	VAROVÁNÍ	
H- věta	H319 Způsobuje vážné podráždění očí	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 delipidace.
- Nepoužívejte kontaminované vzorky.
- Parové vzorky séra na demonstraci sérokonverze nebo významného zvýšení titru je třeba odebrat po 7-14 dnech a pak je simultánně testovat.

Další nutné materiály

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

Fluorescenční mikroskop: Fluorescenční mikroskop pro kalibraci kontrol a konjugátu, 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 excitací 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 IgG protilátek připravte screeningové ředění 1:64 každého testovaného vzorku v PBS. Připravte všechna ředění v minimálním objemu 0.10 ml pomocí PBS jako ředidla.
- Pro kvantitativní titraci sér připravte dvojnásobná sériová ředění vzorku séra v PBS, počínaje ředěním 1:64 a přidáním stejných objemů ředěného séra nebo plazmy a PBS pro každé následující ředění.
- Vyndejte sklíčka z obalu a aplikujte 1 kapku (asi 20 µl) naředěného testovaného vzorku (testovaných 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 sklíčka ve vlhké komůrce po 30 minut při 37°C.
- Omyjte sklíčka v lehkém proudu pufru. Nemíchejte proud přímo do jamek.
- Promývejte sklíčka po 10 minut se změnou roztoku PBS po 5 minutách. Třeptejte sklíčka pohybem držáčku nahoru a dolů v pufru.
- Blotujte okolí testovacích jamek speciálními blotery.
- Aplikujte jednu kapku konjugátu k přímému použití do každé testovací jamky.
- Opakujte kroky 4 (inkubace), 5 (PBS promytí), 6 (10 minutové promytí PBS) a 7 (blotování).
- Aplikujte glycerolové montovací médium a krycí sklíčko 22 X 50 mm.
- Pozorujte reaktivitu pod fluorescenčním mikroskopem pomocí zvětšení 20-40X. Pro nejlepší výsledek stanovuje sklíčka ihned po dokončení testu. Pro získání odpovídajících výsledků ukládejte sklíčka 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 HHV8 IgG protilátek. Fluoreskovat bude lytický antigen, celá buňka, cytoplazma a jádro. Jako interní kontrolu obsahuje každá jamka mikroskopického sklíčka jak HHV8 infikované, tak neinfikované buňky. Příprava sklíčka tímto způsobem je záměrná. Neinfikované buňky, obarvené barvivem červené, poskytují kontrast pozadí. Neinfikované buňky, obarvené červeně, dávají kontrast pozadí. Infekčnost buněk leží v rozmezí 15-50%. Titrace pozitivního séra HHV8 IgG poskytne kvantitativní informaci. V titračních sériích je nejvyšší zředění séra demonstrující reakci 1° interpretováno jako endpoint.

- Absence specifického fluorescenčního barvení infikovaných buněk znamená negativní reakci pro HHV8 IgG protilátky.

Význam pro interpretaci

4. Není rozlišitelná fluorescence infikovaných buněk při screeningovém ředění.	4. Testovaný vzorek je negativní na protilátky HHV8 IgG.
5. Specifická pozitivní fluorescence infikovaných buněk nalezená u screeningového nebo vyššího ředění.	5. Testovaný vzorek je pozitivní na protilátky HHV8 IgG, což indikuje proběhlou infekci HHV8. Sérokonverze nebo čtyřnásobný nebo větší nárůst titru IgG protilátek u parových vzorků séra indikuje nedávnou infekci HHV8.
6. Fluorescence se nachází u infikovaných i u neinfikovaných buněk.	6. Testovaný vzorek vykazuje nespecifickou reakci.

Pozn.: Provedení specifického testu na protilátky HHV8 IgM je vodítkem při diagnóze probíhající infekce HHV8.

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 HHV8, zabudovaná v kitu, demonstruje intenzitu reakce 2° až 4°. Lahvička má uvedený titr 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 HHV8 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.

Titř, který získáte v testování, se může lišit od uvedeného ředění z důvodu mnoha technických důvodů. Nejlepší je testovat titr uvedený na lahvičce a také dvojnásobné ředění těsně předcházející a následující po uvedeném titru. Je normální u výsledků získaných pro endpoint (1') titr, 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
- přesnost 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.
- Jeden pozitivní výsledek na protilátky HHV8 IgG má význam pouze jako indikace předchozího kontaktu nebo infekce viru. Pro epidemiologické účely je jediný test vhodný, nicméně nesmí být použit jako indikace probíhající nebo proběhlé infekce viru. Pro stanovení současné nebo proběhlé infekce je třeba testovat souběžně párové vzorky plazmy nebo séra, odebrané po 7-14 dnech. Indikací pro současnou nebo proběhlou infekci je čtyřnásobný nebo vyšší nárůst titru mezi prvním a druhým vzorkem.
- Nespecifické pozitivní reakce, jako je reakce antinukleárních protilátek a/nebo anticytoplasmických protilátek, se mohou objevit ve vzorcích od pacientů s určitými autoimunitními onemocněními. Jak infikované, tak neinfikované buňky budou fluoreskovat, a to může zastítnit pozitivní reakci HHV8. Takže pozorování autoimunitní reakce nemůže vyloučit možnost infekce HHV8. Srovnání s pozitivní kontrolou, s její reakcí, nebo testování vzorku testem na specifické ANA může pomoci eliminovat falešné pozitivitu.

Očekávané hodnoty

Pokud se použijí oba testy na lytické i latentní protilátky, téměř všichni KS pacienti a ~90% HIV infikovaných homosexuálních mužů vykazují protilátky proti HHV8. Různé sérologické testy, včetně IFA, ELISA a imunoblotu, vykazují různé stavy prevalence protilátek HHV8 v normální dospělé populaci – od tak malých jako 4% až po 25%. Vzhledem k různé citlivosti a specifitě různých imunostanovení bude nutné další testování se standardizací detekčních systémů na vyjasnění prevalence. Séropozitivita není běžná před pubertou.

Charakteristiky provedení

Relativní senzitivita a specifita: Tento kit byl srovnán s kitem HHV8 ORF 65 ELISA kit na stanovení citlivosti a specifity mezi těmito dvěma testy. Studie na 311 lidských vzorcích séra obsahovala vzorky od pacientů s Kaposiho sarkomem, HHV6 a mnohačetnými myelomy. Také byla zahrnuta séra od normálních dárců krve. Data jsou shrnuta v následující tabulce.

SCIMEDX IFA

Alternativní ELISA	Vzorky	HHV8 lytický stav	Reaktivní	Nereaktivní	Celkem
	Kaposiho sarkom	Reaktivní	102	0	102
		Nereaktivní	0	0	
	Dárci krve	Reaktivní	0	1	194
		Nereaktivní	5	188	
	Mnohočetné myelomy	Reaktivní	0	0	10
		Nereaktivní	0	10	
	HHV6 Pozitivní	Reaktivní	0	0	5
Nereaktivní		0	5		
Celkem			107	204	311

Sérologická shoda: =305/311 = 98.1%

Reprodukovatelnost: Šest séropozitivních vzorků s různými titry (1:64 až 1:2048) a jeden séronegativní vzorek byly sériově zředěny dvakrát a stanoveny třikrát každý ve dvou dnech a stanoven endpoint. Všechny 21 endpoint titrů leželo uvnitř specifikace plus nebo minus jedno dvojnásobné ředění.

Identický titr ± jedno dvojnásobné ředění 18/21
3/21

HHV8 specifita: IFA lytický test HHV8 je specifický pro detekci protilátek proti HHV8. Třicet jedna ze 34 sér pozitivních pro IgG protilátky buď proti cytomegaloviru (CMV), Epstein-Barr viru (EBV), lidskému herpes viru 1 (HSV1), lidskému herpes viru 6 (HHV6) nebo varicella zoster viru (VZV), případně kombinaci těchto virů, bylo testováno negativně na HHV8 IgG protilátky tímto testem IFA. Tabulka níže shrnuje data.

Data zkřížené reaktivity-SCIMEDX HHV8 IgG

Typ onemocnění	Vzorků celkem	Pozitivní výsledek
CMV	6	3/6
EBV	21	0/21
HSV1	1	0/1
HHV6	6	1/6
VZV	1	0/1
Celkem	35	4/35

Real Time stabilita: Real time stabilita složek kitu byla provedena v 6 měsíčních intervalech na 24 měsíců. Endpoint titry pozitivních a negativních kontrol byly srovnány s endpoint titry při otevření. Akceptační kritéria jsou endpoint titry v rámci jednoho vzájemného dvojnásobného ředění. Tyto výsledky ležely uvnitř specifikace. Viz následující tabulka.

Real Time stabilita

Šarže sklička	Kontrola	Endpoint titr počáteční	Endpoint titr po 24 měsících
#1	Pozitivní	1:512	1:256
	Negativní	–	–
#2	Pozitivní	1:512	1:512
	Negativní	–	–
#3	Pozitivní	1:512	1:256
	Negativní	–	–

Citace literatury

- Chang, Y., E. Cesarman, M.S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D.M. Knowles, and P.S. Moore. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **265**: 1865-1869.
- Levy, J.A. 1997. Three new human herpesviruses (HHV6, 7 and 8). *Lancet* **349**: 558-562.
- Beral, V. 1996. Epidemiology of Kaposi's sarcoma, in *Cancer Surveys*, vol. 10: Cancer, HIV, and AIDS (Beral, V., Jaffe, H.W., Weiss, R., eds) pp5-22. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Ganem, D. 1996. Human herpesvirus 8 and the biology of Kaposi's sarcoma. *Virology* **7**: 325-332.
- Luppi, M., and G. Torelli. 1996. The new lymphotropic herpesviruses (HHV-6, HHV-7, HHV8) and Hepatitis C Virus (HCV) in human lymphoproliferative diseases: an overview. *Haematologica* **81**: 265-281.
- Kim, S., S.H. Kang, J. Moon, M.S. Kim, Y.S. Kim, K. Park. 1998. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* **30**: 3165.
- Miller, G. M. Rigsby, L. Heston, E. Grogan, R. Sun, C. Metroka, J. Levy, S.-J. Gao, Y. Chang, P. Moore. 1995. Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *New Engl J Med* **334**:1291-1297.
- Lenette, E.T., D.J. Blackbourn, and J.A. Levy. 1996. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* **348**: 858866.
- Blackbourn, D.J., J. Ambroziak, E. Lenette, M. Adams, B. Ramachandran, and J.A. Levy. 1997. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor. *Lancet* **349**: 609-611.
- Simpson, G.R., T.F. Schultz, D. Whitby, P.M. Cook, C. Boshoff, L. Rainbow, M.R. Howard, S.Gao, R.A. Bohezky, P. Simmonds, C. Lee, A. de Ruiter, A. Hatzakis, R.S. Tedder, I.V.D. Weller, R.A. Weiss, and P.S. Moore. 1996. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* **349**: 1133-38.
- Kedes, D.H., D. Ganem, N. Ameli, P. Baccetti, and R. Greenblatt. 1997. The prevalence of serum antibody to human herpesvirus 8 (Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus) among HIV-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. *JAMA* **277**: 478-481.
- Kedes, D.H., E. Operskalski, M. Busch, K. Kohn, J. Flood, D. Ganem. 1996. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Med.* **2**: 918-921.
- Martin, J.N., D.Ee. Ganem, D.H. Osmond, K.A. Page-Shafer, D. Macrae, and D.H. Kedes. 1998. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *New Engl. J Med.* **338**: 948-54.
- Chatlynne, L.G., W. Lapps, M. Handy, Y.Q. Huang, R. Masood, A.S. Hamilton, J.W. Said, H.P. Koeffler, M.H. Kaplan, A. Friedman-Kien, P.S. Gill, J.E. Whitman, and D.V. Ablashi. 1998. Detection and titration of human herpesvirus-8 specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* **92**: 53-58.

SCIMEDX CORPORATION
53 Richbrynton 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



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 Protiděský 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