

INDIRECT FLUORESCENCE ASSAY FOR HUMAN HERPESVIRUS 7 (HHV7) IgG ANTIBODY

EXPORT ONLY

I-HV701G 120 Tests
I-HV702G 40 Tests

Intended Use

The SCIMEDX Indirect Fluorescence Assay (IFA) for Human Herpesvirus 7 (HHV-7) IgG Antibody is intended for the qualitative and semi-quantitative detection of IgG (Immunoglobulin G) antibody to HHV-7 in human serum or plasma. Detection of HHV-7 IgG antibody in humans can be used as an aid in the diagnosis of current infection with the virus and can provide serological evidence of prior infection.

Introduction and Summary of Test Procedures

Human herpesvirus 7 (HHV-7) is a ubiquitous human lymphotropic virus that was identified in 1990 from the T cells of a healthy individual (2). Classified as a member of the family of human herpesviruses, HHV-7 is closely related to HHV-6 and HCMV (1, 7). Like HHV-6, HHV-7 exhibits a tropism for T-cells and has been successfully propagated in a continuous human T-cell line, SupT1 (1). HHV-7 has been frequently isolated from saliva which indicates that the salivary gland may be the site of HHV-7 replication (2, 5, 8). Serological studies by IFA have shown that antibody to HHV-7 is common in the general population (1, 4, 8). HHV-7 primary infection does appear to occur later than the typical primary HHV-6 infection before the age of 2. The prevalence of HHV-7 antibody has been shown to increase gradually with age (1, 8). HHV-7 has been associated with exanthem subitum, an illness known to be caused by HHV-6 (3). No other association with disease has as yet been identified. Further studies are needed to clarify the characteristics of this virus, such as its etiologic role in disease and epidemiology.

The IFA has been shown to be an effective test for detecting HHV-7 IgG antibody. Seroconversion or a 4-fold or greater increase in IgG antibody in paired serum samples is indicative of current infection.

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 HHV-7 antigens forms an antigen/antibody complex with the HHV-7 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

HHV-7 Antigen Slides: Slides of human lymphocytes infected with HHV-7 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.

HHV-7 IgG Positive Control: Each vial contains 0.5 ml HHV-7 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.

HHV-7 IgG Negative Control: Each vial contains 0.5 ml HHV-7 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 antihuman 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
Pictogram		Prevention: <ul style="list-style-type: none"> • Wash thoroughly after handling. • Wear eye/face protection Response: <ul style="list-style-type: none"> • 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: <ul style="list-style-type: none"> • Dispose of content and/or container in accordance with local, regional, national, and/or international regulations.
Signal Word	WARNING	
Hazard Statement	Causes serious eye irritation.	

EU

Component	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Precautionary Statement
Pictogram		Prevention: <p>P264 Wash thoroughly after handling.</p> <p>P280 Wear protective gloves and clothing.</p> Response: <p>P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses if easy to do. Continue rinsing.</p> <p>P337+P313 If irritation persists, get medical advice/attention.</p>
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 1:20 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 1:20 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 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 HHV-7 IgG antibody positive reaction. The fluorescent staining pattern of HHV-7 infected cells is variable. Depending on the cell's stage of infection, the fluorescent pattern can vary from a small portion of the infected cell fluorescing to the whole cell fluorescing. Fluorescence can also range from granular to homogeneous. To provide an internal control, each well on the microscope slide contains both HHV-7 infected and uninfected cells. Preparation of the slide in this manner is intentional. Uninfected cells, stained red by the counterstain, provide a contrasting background. Infectivity of the cells ranges from 20% - 60%. Titration of positive HHV-7 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 HHV-7 IgG antibody negative reaction.

Significance of Interpretation

1. No discernible fluorescence of the infected cells found at the screening dilution.	1. Test sample is HHV-7 IgG antibody negative.
2. Specific positive fluorescence of the infected cells found at the screening dilution or at higher dilutions.	2. Test sample is HHV-7 IgG antibody positive, indicating previous HHV-7 infection. Seroconversion or a four-fold or greater rise in IgG antibody titer in paired serum samples indicates recent infection with HHV-7.
3. Fluorescence found in both infected and uninfected cells.	3. Test sample is exhibiting a nonspecific reaction.

Note: Performance of a HHV-7 IgM antibody specific test aids in the diagnosis of a current HHV-7 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 HHV-7 antibody positive control furnished with this kit demonstrates a 3⁺ to 4⁺ intensity reaction. The vial has a listed titer to use as an additional check for the test system (see 1⁺ Dilution Notice). Use this as the calibrator for a 3⁺ to 4⁺ intensity reaction on your microscope.
- Use the HHV-7 antibody negative control furnished with this kit as the calibrator for a negative reaction on your equipment.
- Each day's test should include one PBS well in place of a test sample. This is a conjugate control to ensure the conjugate is not reacting with the cell substrate.

1⁺ Dilution Notice

The positive control in this kit is ready to use and provides a 3⁺ to 4⁺ fluorescent intensity when tested. To obtain a 1⁺ fluorescent intensity make two-fold dilutions to the titer indicated on the vial included in this kit. Titer the positive control with the initial use of the kit.

The titer you obtain in testing may differ from the listed endpoint titer due to a number of technical reasons. It is best to test the titer indicated on the vial, as well as the two-fold dilution immediately preceding and following the listed titer. It is normal for results obtained for an endpoint (1⁺) titer to differ between laboratories due to factors affecting the intensity of fluorescence. These factors include:

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

Limitations of the Procedure

- A serological test such as the IFA serves as an aid to detect viral infection, but its use should not be the sole criteria. The test results should be used in conjunction with information available from the patient, clinical evaluation and other available diagnostic procedures.
- A single positive result for HHV-7 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 HHV-7 reaction. Therefore, observation of an autoimmune reaction cannot eliminate the possibility of HHV-7 infection.

Performance Characteristics

Relative Sensitivity and Specificity: The SCIMEDX HHV7 IFA kit was evaluated relative to a commercially available HHV7 IFA. The samples were frozen retrospective sera. Twenty-eight sera were from normals of various ages, both genders and geographical areas. The overall agreement was 27/28 or 96.4%. Refer to the following table.

SCIMEDX HHV7 IFA				
Alternate IFA	HHV7 Status	Positive	Negative	Total
Positive	21	0	21	
Negative	1	6	7	
Total	22	6	28	

Please be advised that 'relative' refers to the comparison of this assay's results to that of a similar assay. There was not an attempt to correlate the assay's results with disease presence or absence. No judgment can be made on the comparison assay's accuracy to predict disease.

Reproducibility: Eight positive sera with various titers (1:20-1:160) and three negative serum were serially diluted and assayed three times each and the endpoint determined. All endpoint titers were within the specifications of \pm one two-fold dilution. Refer to the following table.

Identical Titer \pm one, two-fold dilution	28/33
	5/33

Specificity: The IFA test for HHV7 is a specific test for detecting antibodies to HHV7. Ten sera positive for antibody activity to diseases that have the potential for cross-reactivity to HHV7 were tested on this IFA kit. No cross-reactivity was observed for any of the samples. The table below summarizes the data.

Cross Reactivity Data-SCIMEDX HHV7 IgG		
Disease Type	Total Samples	Positive Result
Cytomegalovirus	7	0/7
Epstein-Barr virus	10	0/10

Herpes Simplex virus 1&2	9	0/9
Herpes Simplex virus 6	5	0/5
Herpes Simplex virus 8	3	0/3
Varicella Zoster virus	10	0/10
Total	10	0/10

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 tiers at release. Acceptance criteria are endpoint titers within one two-fold dilution of each other. These results were within specifications. Refer to the table below.

Real Time Stability

Slide Lot	Control	Endpoint Titer at Release	Endpoint Titer at 24 months
#1	Positive	1:640	1:640
	Negative	-	-
#2	Positive	1:320	1:320
	Negative	-	-
#3	Positive	1:320	1:320
	Negative	-	-

Literature Cited

- Berneman, Z.N., D.V. Ablashi, G. Li, M. Eger-Fletcher, M.S. Reitz, Jr., C.L. Hung, I. Brus, A.L. Komaroff, and R.C. Gallo. 1992. Human herpesvirus 7 is a T-lymphotropic virus and is related to, but significantly different from, human herpesvirus 6 and human cytomegalovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**:10552-10556.
- Frenkel, N., E.C. Schirmer, L.S. Wyatt, G. Katsafanas, E. Roffman, R.M. Danovich, and C.H. June. 1990. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**:748-752.
- Tanaka, K., T. Kondo, S. Torigoe, S. Okada, T. Mukai, and K. Yamanishi. 1994. Human herpesvirus-7: another causal agent for roseola (exanthem subitum). Pediatrics. **125**:1-5.
- Wyatt, L.S., W.J. Rodriguez, N. Balachandran, and N. Frenkel. 1991. Human herpesvirus-7: antigenic properties and prevalence in children and adults. J. Virol. **65**:6260-6265.
- Wyatt, L.S. and N. Frenkel. 1992. Human herpesvirus-7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. J. Virol. **66**:3206-3209.
- Yamanishi, K., T. Okuno, K. Shiraki, M. Takahashi, T. Kondo, Y. Asano, and T. Kurata. 1988. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. Lancet. *i*:1065-1067.
- Yasukawa, M., Y. Yakushiji, M. Furukawa, and S. Fujita. 1993. Specificity analysis of human CD4+ T-cell clones directed against human herpesvirus 6 (HHV-6), HHV-7, and human cytomegalovirus. J. Virol. **67**:6259-6264.
- Yoshikawa, T., Y. Asano, K. Kobayashi, T. Nakashima, T. Yazaki, S. Suga, T. Ozak, L.S. Wyatt, and N. Frenkel. 1993. Sero-epidemiology of human herpesvirus-7 in healthy children and adults in Japan. J. Med. Virol. **27**:53-57.

 SCIMEDX CORPORATION
53 Highpointon 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 FLUORESZENZ-ASSAY AUF IgG-ANTIKÖRPER GEGEN MENSCHLICHES HERPESVIRUS 7 (HHV7)

Nur zum Export bestimmt

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

I-HV701G 120 Tests
I-HV702G 40 Tests

Verwendungs zweck

Der indirekte Immunfluoreszenz-Assay (IFA) für IgG-Antikörper gegen das menschliche Herpesvirus 7 (HHV7) von SCIMEDX Corp. dient zum qualitativen und semi-quantitativen Nachweis von IgG (Immunglobulin G) Antikörpern gegen HHV7 in Humanserum oder Plasma. Der Nachweis von IgG-Antikörpern gegen HHV7 beim Menschen kann als Hilfe bei der Diagnose einer frischen Infektion mit diesem Virus sowie als serologischer Nachweis einer zurückliegenden Infektion dienen.

Einführung und Übersicht über die Testverfahren

Das menschliche Herpesvirus 7 (HHV7) ist ein weit verbreitetes lymphotropes Virus beim Menschen, das im Jahr 1990 in den T-Zellen einer gesunden Person identifiziert wurde. (2) HHV7 wurde als Mitglied der Familie menschlicher Herpesviren klassifiziert und ist eng mit HHV6 und HCMV verwandt. (1, 7) Genau wie HHV6 weist auch HHV7 Tropismus für T-Zellen auf. Es wurde erfolgreich in einer kontinuierlichen menschlichen T-Zelllinie, SupT1, propagiert. (1) HHV7 wurde häufig im Speichel isoliert. Dies weist darauf hin, dass die HHV7-Replikation vermutlich in der Speicheldrüse stattfindet. (2, 5, 8) Serologische Studien anhand von IFA-Tests haben gezeigt, dass Antikörper gegen HHV7 in der allgemeinen Population verbreitet sind. (1, 4, 8) Die primäre Infektion mit HHV7 scheint später aufzutreten als die typische HHV6-Infektion (vor dem Alter von 2 Jahren). Es wurde nachgewiesen, dass die Prävalenz von HHV7-Antikörpern mit dem Alter zunimmt. (1, 8) HHV7 wurde mit Dreitageieber (Exanthem subitum) assoziiert, eine Krankheit die bekanntlich von HHV6 verursacht wird. (3) Bissher wurde noch keine andere Assoziation mit einer Krankheit identifiziert. Es sind weitere Studien erforderlich, um die Charakteristika dieses Virus, wie z. B. seine etiologische Bedeutung für Erkrankungen und die Epidemiologie, genauer zu bestimmen.

Der IFA-Test hat sich als wirksam zum Nachweis von HHV7 IgG-Antikörpern erwiesen. Eine Serokonversion bzw. ein mindestens vierfach höherer Anstieg im IgG-Antikörper-Titer bei Serumprobenpaaren weist auf eine frische Infektion hin.

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 Virus-Antigenen gegeben, die sich in farbmarkierten Kavitäten auf Glas-Objekträgern befinden. Während der 30-minütigen Inkubationszeit bilden für HHV7-Antigen typische Antikörper einen Antigen/Antikörperkomplex mit den HHV7-Antigenen in den infizierten Zellen. Unspezifische Antikörper und andere freie Serumproteine werden in einem kurzen Waschvorgang entfernt. Fluoreszin-konjugiertes Antihuman-IgG von der Ziege wird dann in die Kavitäten auf dem Glas-Objekträger 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 Objekträger unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Eine positive Antikörperreaktion wird durch leuchtend grüne Fluoreszenz an den Antigenstellen charakterisiert.

Bestandteile des Testkits und Lagerbedingungen

HHV7-Antigen-Objekträger: Objekträger mit menschlichen Lymphozyten, die mit HHV7 infiziert sind, auf jeder Glaskavität. Die Objekträger sind gebrauchsfertig, sobald sie aus dem Beutel entfernt werden. Bei 2–8 °C lagern. Bei diesen Lagerbedingungen sind die Objekträger bis zum auf dem Beutelletikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

HHV7 IgG-positive Kontrolle: Jedes Fläschchen enthält 0,5 ml HHV7 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.

HHV7 IgG-negative Kontrolle: Jedes Fläschchen enthält 0,5 ml HHV7 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.

Fluoreszin-Konjugat: Jedes Fläschchen enthält 1,5 ml Fluoreszin-konjugiertes (inaktiviertes) Antihuman-IgG von der Ziege (schwere und leichte Kette) mit Evans Blue- und Rhodamin-Gegenfärbung. Das Fluoreszin-Konjugat ist eine Konjugation aus mithilfe von Affinitätschromatographie gereinigtem Antihuman-IgG und Fluoreszin-Isothiocyanat (FITC). Durch das 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 Verblassungsschutz. Diese Komponente ist eine gebrauchsfertige Flüssigkeit. Lagertemperatur: Kühlenschrank bis Zimmertemperatur (2–30 °C). Bei diesen Lagerbedingungen ist das Eindeckmittel bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): Jedes versiegelte aluminierte Päckchen mit Pulverpuffer reicht für 1 Liter 1x PBS aus. Lagertemperatur: Kühlenschrank 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 Löschkpapier: Saugfähiges Löschkpapier hat vorgestanzte Löcher zum Trocknen der Objekträgermaske. Lagertemperatur: Kühlenschrank 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-Objekträger: Die Zellen auf allen IFA Antigen-Objekträgern sind fixiert und enthalten kein lebensfähiges infektiöses Material. Gute Laborpraxis (GLP) erfordert jedoch die gleiche umsichtige Handhabung und Entsorgung der Objekträger wie bei allen anderen potenziellen biologischen Gefahrstoffen im Labor.

- * Die Objekträger erst kurz vor Gebrauch aus dem Schutzbeutel nehmen.
- * Nicht wiederverwenden Objekträger.

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

X 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	ICSO01 PBS Powder Packets	Sicherheitshinweis Prävention:
	O-GLB01Y Mounting Medium	P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen. P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
Piktogramm		Antwort: P305+P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
Signalwort	ACHTUNG	P337+P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
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, Gesteile, Pipetten, Mikrotiterplatten und Sicherheits-Pipettierzubehör zur Herstellung der Probenverdünnungen.
- * Inkubator, 37 °C
- * Feuchte Kammer zur Inkubation der Objekträger
- * Objekträgergestell und Färbeschale zum Waschen der Objekträger
- * Deckgläser: 22 x 50 mm, Glas Stärke 1

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

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

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

IFA-Verfahren

1. Für einen qualitativen IgG-Antikörper-Nachweis eine Screening-Lösung im Verhältnis 1:20 für jede Probe in phosphorgepufferter Kochsalzlösung herstellen. Alle Verdünnungen in einem Mindestvolumen von 0,10 ml mit phosphorgepufferter Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel herstellen.
2. Für eine quantitative Titrierung der Seren eine zweifache Serenverdünnung der Serumprobe in PBS herstellen. Dabei mit einer Verdünnung von 1:20 beginnen und gleiche Mengen an verdünntem Serum oder Plasma und PBS für jede Verdünnung zugeben.
3. Die Objekträger 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).
4. Die Objekträger 30 Minuten lang bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
5. Die Objekträger in einem dünnen Strahl Pufferlösung spülen. Den Strahl nicht direkt auf die Kavitäten richten.
6. Die Objekträger 10 Minuten lang waschen. Dabei die PBS-Lösung nach 5 Minuten wechseln. Die Objekträger mit dem Gestell in der Pufferlösung auf und ab bewegen.
7. Die Farbmaske um die Kavitäten mit dem speziellen Löschkpapier abtpufen.
8. Einen Tropfen des gebrauchsfertigen Konjugats in jede Kavität geben.
9. Die Schritte 4 (Inkubation), 5 (PBS-Spülung), 6 (10-minütige PBS-Wäsche) und 7 (Abtpufen) wiederholen.
10. Das Glycerol-Eindeckmittel und das Deckglas (22 x 50 mm) anbringen.
11. Die Reaktivität bei 20–40-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachten. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die Objekträger direkt nach Abschluss des Tests untersucht werden. Für gleichwertige Ergebnisse die Objekträger versiegeln oder feucht aufbewahren, um den Feuchtigkeitsverlust des Eidecks mittels zu minimieren. Im Dunkeln bei 2–8 °C aufbewahren und innerhalb von 3 Tagen die Ergebnisse ablesen. Eine positive Reaktivität kann durch eine

intensive bis schwache Fluoreszenz gekennzeichnet sein. Die Fluoreszenzreaktion nach der folgenden Intensitätsskala bewerten: 4⁺ (intensiv), 3⁺ (leuchtend), 2⁺ (mäßig), 1⁺ (schwach).

Auswertung der Ergebnisse

- Eine leuchtend grüne fluoreszierende Färbung der infizierten Zellen weist auf eine HHV7 IgG-Antikörper-positive Reaktion hin. Das fluoreszierende Färbemuster ist bei mit HHV7 infizierten Zellen unterschiedlich. Je nach Infektionsstadium der Zelle kann das fluoreszierende Muster nur einen geringen Teil der Zelle bis zur gesamten Zelle ausmachen. Die Fluoreszenz kann außerdem von granular bis homogen reichen. Zur internen Kontrolle enthält jede Kavität auf dem Objekträger sowohl mit HHV7 infizierte als auch nicht infizierte Zellen. Der Objekträger wird mit Absicht so präpariert. Die nicht infizierten Zellen werden von der Gegenfärbung rot gefärbt und dienen als kontrastierender Hintergrund. Die Infektiosität der Zellen liegt zwischen 20 und 60 %. Die Titrierung positiver HHV7 IgG-Seren liefert quantitative Informationen. In einer Titrierungsreihe gilt die höchste Serumverdünnung, bei der eine Reaktion von 1⁺ eintritt, als Endpunkt.
- Die Abwesenheit einer spezifischen fluoreszierenden Färbung der infizierten Zellen weist auf eine HHV7 IgG-Antikörper-negative Reaktion hin.

Bedeutung der Auswertung

1. Keine feststellbare Fluoreszenz der infizierten Zellen mit der Screening-Lösung	1. Probe ist HHV7 IgG-Antikörper-negativ.
2. Spezifische positive Fluoreszenz der infizierten Zellen mit der Screening-Lösung oder bei höheren Verdünnungen	2. Probe ist HHV7 IgG-Antikörper-positiv. Dies weist auf eine zurückliegende HHV7-Infektion hin. Eine Serokonversion bzw. ein mindestens vierfach höherer Anstieg im IgG-Antikörper-Titer bei Serumprobenpaaren weist auf eine kürzlich erfolgte Infektion mit HHV7 hin.
3. Fluoreszenz sowohl bei infizierten als auch nicht infizierten Zellen	3. Die Probe weist eine unspezifische Reaktion auf.

Hinweis: Die Durchführung eines HHV7 IgM-Antikörper-spezifischen Tests unterstützt die Diagnose einer frischen HHV7-Infektion.

Qualitätskontrolle

- Zur Überprüfung der ordnungsgemäßen Funktion des Tests mindestens einmal täglich die positive und negative Kontrolle verwenden.
- Art und Alter des Fluoreszenzmikroskops sowie die Betriebsstunden der UV-Lampe können die Fluoreszenzintensität und die Titrations-Endpunkte bis zu einem gewissen Grad beeinflussen. Die in diesem Kit enthaltene HHV7-Antikörper-positive Kontrolle wird in abgepackt, die eine Intensitätsreaktion von 3⁺ 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 3⁺ to 4⁺ Intensitätsreaktion auf Ihrem Mikroskop zu verwenden.
- Die im Kit enthaltene HHV7-Antikörper-negative Kontrolle als Kalibrator für eine negative Reaktion mit Ihrer Ausrüstung verwenden.
- 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 Zellsubstrat reagiert.

1⁺ Verdünnungshinweis

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

- die Nennleistung der UV-Lichtquelle im Mikroskop
- die Art der Lichtquelle
- das Alter der Lampe
- die Länge des optischen Pfads im Mikroskop und die Art der verwendeten optischen Filter
- die Genauigkeit der Verdünnungstechniken und die verwendete Ausrüstung

Einschränkungen des Verfahrens

- Ein serologischer Test wie z. B. ein IFA-Test dient als Hilfe beim Nachweis einer Virusinfektion, sollte jedoch nicht als einziges Kriterium verwendet werden. Die Testergebnisse sind in Verbindung mit vom Patienten zur Verfügung gestellten Informationen, einer klinischen Beurteilung sowie anderen verfügbaren Diagnoseverfahren zu verwenden.
- Ein einzelnes positives Ergebnis für HHV7 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 Problem 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.
- Unspezifische positive Reaktionen wie z. B. antinukleäre und/oder antizyttoplasmatische Antikörperraaktionen können in Proben von Patienten mit bestimmten Autoimmunerkrankungen auftreten. Sowohl infizierte als auch nicht infizierte Zellen fluoreszieren. Dies kann eine positive HHV7-Reaktion verdecken. Daher schließt das Auftreten einer Autoimmunreaktion nicht die Möglichkeit einer HHV7-Infektion aus.

Leistungscharakteristika

Relative Sensitivität und Spezifität: Das HHV7 IFA-Kit von SCIMEDX Corp. wurde im Vergleich mit einem im Handel erhältlichen HHV7 IFA-Kit bewertet. Die Proben waren eingefrorene retrospektive Seren. Achtundzwanzig Seren stammten von normalen Personen unterschiedlichen Alters, Geschlechts und geographischer Herkunft. Die Gesamtübereinstimmung betrug 27/28 bzw. 96,4 %. Siehe folgende Tabelle.

SCIMEDX HHV7 IFA				
Alternativer IFA-Test	HHV7-Status	Positiv	Negativ	Gesamt
	Positiv	21	0	21
	Negativ	1	6	7
	Gesamt	22	6	28

Es ist zu beachten, dass sich der Begriff „relativ“ auf den Vergleich der Ergebnisse dieses Assays mit denen eines ähnlichen Assays bezieht. Es wurde nicht versucht, die Ergebnisse des Assays mit der Anwesenheit oder Abwesenheit der Krankheit zu korrelieren. Die Vorhersagegenauigkeit des Vergleichsassays für die Krankheit kann nicht beurteilt werden.

Reproduzierbarkeit: Acht positive Seren mit verschiedenen Titern (1:20–1:160) und drei negative Seren wurden nacheinander verdünnt und jede Probe wurde dreimal getestet und deren Endpunkt bestimmt. Alle Endpunkt-Titer lagen innerhalb der Spezifikationen für ± eine zweifache Verdünnung. Siehe folgende Tabelle.

Identischer Titer ± eine zweifache Verdünnung	28/33 5/33
--	---------------

Spezifität: Der IFA-Test für HHV7 ist ein spezifischer Test zum Nachweis von Antikörpern gegen HHV7. Zehn Seren, die eine positive Reaktion auf Antikörper gegen Krankheiten aufwiesen, die möglicherweise eine Kreuzreaktion mit HHV7 aufweisen können, wurden mit dem IFA-Kit getestet. Es wurde bei keiner der Proben eine Kreuzreakтивität beobachtet. Die untenstehende Tabelle enthält eine Zusammenfassung der Daten.

Daten zur Kreuzreakтивität: SCIMEDX HHV7 IgG-Test

Art der Erkrankung	Proben gesamt	Positives Ergebnis
Zytomegalievirus	7	0/7
Epstein-Barr-Virus	10	0/10
Herpes-simplex-Virus 1 und 2	9	0/9
Herpes-simplex-Virus 6	5	0/5
Herpes-simplex-Virus 8	3	0/3
Varicella-Zoster-Virus	10	0/10
Gesamt	10	0/10

Echtheitstabilität: Die Echtheitstabilität 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.

Echtheitstabilität

Objektträger-Charge	Kontrolle	Anfänglicher Endpunkt-Titer	Endpunkt-Titer nach 24 Monaten
Nr. 1	Positiv	1:640	1:640
	Negativ	-	-
Nr. 2	Positiv	1:320	1:320
	Negativ	-	-
Nr. 3	Positiv	1:320	1:320
	Negativ	-	-

Literaturnachweis

- Berneman, Z.N., D.V. Ablashi, G. Li, M. Eger-Fletcher, M.S. Reitz, Jr., C.L. Hung, I. Brus, A.L. Komaroff, and R.C. Gallo. 1992. Human herpesvirus 7 is a T-lymphotropic virus and is related to, but significantly different from, human herpesvirus 6 and human cytomegalovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**:10552–10556.
- Frenkel, N., E.C. Schirmer, L.S. Wyatt, G. Katsafanas, E. Roffman, R.M. Danovich, and C.H. June. 1990. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**:748–752.
- Tanaka, K., T. Kondo, S. Torioge, S. Okada, T. Mukai, and K. Yamanishi. 1994. Human herpesvirus-7: another causal agent for roseola (exanthem subitum). Pediatrics. **125**:1–5.
- Wyatt, L.S., W.J. Rodriguez, N. Balachandran, and N. Frenkel. 1991. Human herpesvirus-7: antigenic properties and prevalence in children and adults. J. Virol. **65**:6260–6265.
- Wyatt, L.S. and N. Frenkel. 1992. Human herpesvirus-7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. J. Virol. **66**:3206–3209.
- Yamanishi, K., T. Okuno, K. Shiraki, M. Takahashi, T. Kondo, Y. Asano, and T. Kurata. 1988. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. Lancet. *i*:1065–1067.
- Yasukawa, M., Y. Yakushijin, M. Furukawa, and S. Fujita. 1993. Specificity analysis of human CD4+ T-cell clones directed against human herpesvirus 6 (HHV-6), HHV-7, and human cytomegalovirus. J. Virol. **67**:6259–6264.
- Yoshikawa, T., Y. Asano, K. Kobayashi, T. Nakashima, T. Yazaki, S. Suga, T. Ozak, L.S. Wyatt, and N. Frenkel. 1993. Seroprevalence of human herpesvirus-7 in healthy children and adults in Japan. J. Med. Virol. **27**:53–57.

 SCIMEDX CORPORATION
53 Richbenton 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 INDIRETTA PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI IgG CONTRO L'HERPESVIRUS UMANO 7 (HHV7)

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

I-HV701G 120 Tests
I-HV702G 40 Tests

Uso previsto

Il saggio di fluorescenza indiretta (IFA) SCIMEDX Corp. per la determinazione degli anticorpi IgG contro l'herpesvirus umano 7 (HHV7) è destinato alla rilevazione qualitativa e semiquantitativa degli anticorpi IgG (immunglobuline G) contro HHV7 nel siero o nel plasma umano. La determinazione di anticorpi IgG HHV7 in campioni umani può essere utilizzata come ausilio nella diagnosi dell'infezione in corso con tale virus e può fornire un'evidenza sierologica dell'infezione precedente.

Introduzione e riepilogo delle procedure d'analisi

L'herpesvirus umano 7 (HHV7) è un virus linfotropico umano ubiquitario che è stato identificato nel 1990 dalle cellule T in un individuo sano (2). Classificato come un membro della famiglia degli herpesvirini umani, l'HHV7 è strettamente correlato all'HHV6 a all'HHV1 (1,7). Come l'HHV6, l'HHV7 mostra un tropismo per le cellule T ed è stato propagato con successo in una linea cellulare continua di cellule T, SupT1 (1). L'HHV7 è stato isolato frequentemente dalla saliva, suggerendo che la ghiandola salivare potrebbe essere il sito della replicazione dell'HHV7 (2,5,8).

Gli studi sierologici con l'IFA mostrano che l'anticorpo HHV7 è comune nella popolazione generale (1,4,8). L'infezione primaria dell'HHV7 si verifica più tardi rispetto alla tipica infezione primaria dell'HHV6, prima dei 2 anni. La prevalenza degli anticorpi HHV7 sembra aumentare gradualmente con l'età (1,8). L'HHV7 è stato associato con la sesta malattia, che è notoriamente causata dall'HHV6 (3). Non sono state identificate altre associazioni con malattie. Sono necessari ulteriori studi per chiarire le caratteristiche di questo virus, quali il ruolo eziologico nella malattia e l'epidemiologia.

È stato dimostrato che l'IFA è un test efficace per la determinazione degli anticorpi HHV7. La sieroconversione o l'aumento di quattro volte o anche maggiore degli anticorpi IgG in coppie di campioni di siero indica una infezione in corso.

Principio del test

I saggi con anticorpo fluorescente SCIMEDX Corp. usano il metodo indiretto per il rilevamento degli anticorpi e la determinazione del titolo. I campioni di siero o di plasma del paziente sono aggiunti alle cellule in coltura contenenti gli antigeni virali inattivati e fissate su pozzetti, distinguibili grazie alla maschera, su vetrini per microscopio. Durante un'incubazione di 30 minuti, l'anticorpo specifico per gli antigeni dell'HHV7 forma un complesso antigene/anticorpo con gli antigeni dell'HHV7 nelle cellule infettate. Una breve fase di lavaggio permette di eliminare l'anticorpo non specifico e altre proteine sieriche che non hanno reagito. L'IgG anti-umana di capra coniugata con fluoresceina viene quindi applicata 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 HHV7: vetrini con linfociti umani infettati da HHV7 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-HHV7: ogni fiala contiene 0,5 ml di controllo umano positivo per anticorpo IgG HHV7. Questo reagente 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 HHV7: ogni fiala contiene 0,5 ml di controllo umano negativo per IgG HHV7. Questo reagente 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 chromatografia 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 reagente è un liquido pronto per l'uso. Conservare a 2–8 °C; in questa condizione di conservazione il coniugato liquido è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala.

Mezzo di montaggio per vetrino coprioggetto: ogni fiala contiene 2,0 ml di glicerolo in tampone fosfato con ritardante della dissolvenza. Questo reagente 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 dà 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. Nota: 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 di potenza U.S.

- 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 scorrevare 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. Comunque 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 substrato.

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 potenzialmente a rischio biologico.

X 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. Risposta: P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
AVVERTENZA	ATTENZIONE	P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciaccquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciaccquare. 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 asciuttamente 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 si desidera, si possono conservare i campioni di siero o di plasma freschi a 2–8 °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.
- Si dovrebbero prelevare campioni in doppio 7–14 giorni dopo, congelarli e testarli contemporaneamente per dimostrare la sieroconversione o il significativo aumento del titolo

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 bacinette per il lavaggio dei vetrini
- Vetrini coprioggetto: 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

1. Per la determinazione qualitativa di anticorpi IgG, preparare una diluizione di analisi di 1:20 in PBS per ogni campione da testare. Preparare tutte le diluizioni in un volume minimo di 0,10 ml con PBS come diluente.
2. Per la titolazione quantitativa dei sieri, eseguire due diluizioni seriali dei campioni di siero in PBS a partire da una diluizione di 1:20, aggiungendo volumi equivalenti di siero o plasma diluito e PBS per ogni diluizione consecutiva.
3. 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. Nota: 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).
4. Incubare i vetrini in una camera umida per 30 minuti a 37 °C.
5. Risciacquare i vetrini con un flusso delicato di tampone, evitando di dirigere il flusso direttamente sui pozzetti.
6. 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.
7. Asciugare la maschera colorata che circonda i pozzetti del test con gli speciali tamponi di carta assorbente.
8. Applicare una goccia del coniugato pronto per l'uso a ogni pozzetto del test.
9. Ripetere i passaggi 4 (incubazione), 5 (risciacquo con PBS), 6 (lavaggio di 10 minuti in PBS) e 7 (asciugatura).
10. Applicare il mezzo di montaggio a base di glicerolo e il vetrino coprioggetto da 22 x 50 mm.

11. 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 infettate con una fluorescenza verde luminosa indica una reazione positiva per gli anticorpi IgG HHV7. Il pattern di colorazione fluorescente delle cellule infettate con HHV7 è variabile. In base allo stadio di infezione della cellula, il pattern fluorescente può variare dalla fluorescenza di una piccola porzione della cellula infettata alla fluorescenza dell'intera cellula infettata. La fluorescenza può anche variare da granulare a omogenea. Per fornire un controllo interno, ogni pozzetto del vetrino per microscopio contiene sia cellule infettate che non infettate con HHV7. La preparazione del vetrino in questo modo è intenzionale. Le cellule non infettate, colorate di rosso con colorante di contrasto, forniscano un background del contrasto. L'infettività delle cellule varia dal 20 % al 60 %. La titolazione dei sieri positivi per IgG HHV7 fornisce 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 infettate indica una reazione negativa per gli anticorpi IgG HHV7.

Importanza dell'interpretazione

1. Non si riscontra alcuna fluorescenza distinguibile delle cellule infettate alla diluizione di analisi.	1. Il campione del test è negativo per gli anticorpi IgG HHV7.
2. Si riscontra fluorescenza positiva specifica delle cellule infettate alla diluizione di analisi o a diluizioni più alte.	2. Il campione del test è positivo per gli anticorpi IgG HHV7 indicando la precedente infezione con HHV7. La sieroconversione 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 HHV7.
3. Si riscontra fluorescenza sia nei campioni infetti che in quelli non infetti.	3. Il campione del test mostra una reazione non specifica.

Note: l'esecuzione di un test specifico per gli anticorpi IgM HHV7 aiuta nella diagnosi di un'infezione da HHV7 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 anti-HHV7 fornito con questo kit dà una reazione con intensità 3⁺–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 3⁺ a 4⁺ con il microscopio in uso.
- Utilizzare il controllo negativo per gli anticorpi HHV7 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 3⁺ a 4⁺, quando testato. Per ottenere un'intensità di fluorescenza pari a 1⁺, diluire due volte il titolo indicato sulla fiala inclusa in questo kit. Titolare il controllo positivo quando si utilizza un nuovo kit.

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

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

Limiti della procedura

1. 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.
2. Un singolo risultato positivo per gli anticorpi IgG HHV7 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 o 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.
3. Nei campioni di pazienti con alcune malattie autoimmuni si possono verificare reazioni positive non specifiche, quali reazioni degli anticorpi antinucleari e/o anticitoplasmatici. Sia le cellule infettate che quelle non infettate possono presentare fluorescenza, nascondendo una reazione positiva per l'HHV7. Ne consegue che l'osservazione di una reazione autoimmune non può eliminare la possibilità di infezione dell'HHV7.

Caratteristiche prestazionali

Sensibilità e specificità relative: il test IFA per la determinazione degli anticorpi HHV7 SCIMEDX Corp. è stato valutato rispetto a un test IFA per la determinazione degli anticorpi HHV7 disponibile sul mercato. I campioni erano sieri retroattivi congelati. Ventotto sieri provenivano da individui sani di varie età, genere e area geografica. La concordanza totale era 27/28 o del 96,4 %. Consultare la tabella seguente.

IFA per la determinazione degli anticorpi HHV7 PANBIO				
IFA alternativo	Stato dell'HHV7	Positivo	Negativo	Totale
	Positivo	21	0	21
	Negativo	1	6	7
	Totale	22	6	28

Si deve notare che "rispetto a" è riferito al confronto dei risultati di questo saggio a quelli di un saggio simile. Vi è stato un tentativo di correlare i risultati del saggio con la presenza o l'assenza della malattia; non può essere espresso alcun giudizio sull'accuratezza del saggio di confronto nella predizione della malattia.

Riproducibilità: otto sieri positivi con vari titoli (1:20–1:160) e tre sieri negativi sono stati diluiti serialmente e testati tre volte ognuno ed è stato determinato l'endpoint. Tutti i titoli di endpoint erano all'interno delle specifiche di ± una doppia diluizione. Consultare la tabella seguente.

Titolo identico ± una, doppia diluizione	28/33
	5/33

Specificità: il test IFA per l'HHV7 è un test specifico per la determinazione di anticorpi HHV7. Con questo kit IFA, sono stati testati 10 sieri positivi per l'attività anticorpale verso le malattie che possono dare reattività crociata con l'HHV7. Non è stata osservata alcuna reattività crociata per nessun campione. La tabella seguente riepiloga i dati.

Dati di reattività crociata- SCIMEDX per IgG HHV7

Tipo di malattia	Campioni totali	Risultato positivo
Citomegalovirus	7	0/7
Virus di Epstein-Barr	10	0/10
Virus dell'herpes simplex di tipo 1 e 2	9	0/9
Virus dell'herpes simplex di tipo 6	5	0/5
Virus dell'herpes simplex di tipo 8	3	0/3
Virus della varicella-zoster	10	0/10
Totale	10	0/10

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 doppia diluizione. 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	1:640	1:640
	Negativo	-	-
#2	Positivo	1:320	1:320
	Negativo	-	-
#3	Positivo	1:320	1:320
	Negativo	-	-

Riferimenti bibliografici citati

- Berneman, Z.N., D.V. Ablashi, G. Li, M. Eger-Fletcher, M.S. Reitz, Jr., C.L. Hung, I. Brus, A.L. Komaroff, and R.C. Gallo. 1992. Human herpesvirus 7 is a T-lymphotropic virus and is related to, but significantly different from, human herpesvirus 6 and human cytomegalovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**:10552–10556.
- Frenkel, N., E.C. Schirmer, L.S. Wyatt, G. Katsafanas, E. Roffman, R.M. Danovich, and C.H. June. 1990. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**:748–752.
- Tanaka, K., T. Kondo, S. Torigoe, S. Okada, T. Mukai, and K. Yamanishi. 1994. Human herpesvirus-7: another causal agent for roseola (exanthem subitum). Pediatrics. **125**:1–5.
- Wyatt, L.S., W.J. Rodriguez, N. Balachandran, and N. Frenkel. 1991. Human herpesvirus-7: antigenic properties and prevalence in children and adults. J. Virol. **65**:6260–6265.
- Wyatt, L.S. and N. Frenkel. 1992. Human herpesvirus-7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. J. Virol. **66**:3206–3209.
- Yamanishi, K., T. Okuno, K. Shiraki, M. Takahashi, T. Kondo, Y. Asano, and T. Kurata. 1988. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. Lancet. **i**:1065–1067.
- Yasukawa, M., Y. Yakushiji, M. Furukawa, and S. Fujita. 1993. Specificity analysis of human CD4+ T-cell clones directed against human herpesvirus 6 (HHV-6), HHV-7, and human cytomegalovirus. J. Virol. **67**:6259–6264.
- Yoshikawa, T., Y. Asano, K. Kobayashi, T. Nakashima, T. Yazaki, S. Suga, T. Ozak, L.S. Wyatt, and N. Frenkel. 1993. Sero-epidemiology of human herpesvirus-7 in healthy children and adults in Japan. J. Med. Virol. **27**:53–57.

 SCIMEDIX CORPORATION
53 Richbenton Rd
Dover, NJ 07801 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8796
www.scimedix.com

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





PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG DEL HERPESVIRUS HUMANO 7 (HHV7)

Sólo para exportación

Para uso diagnóstico *in vitro*.

I-HV701G	120 Tests
I-HV702G	40 Tests

Uso previsto

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA) de SCIMEDX para la detección del anticuerpo IgG del herpesvirus humano 7 (VHH-7) está diseñada para la detección cualitativa y semicuantitativa del anticuerpo IgG (inmunoglobulina G) frente al VHH-7 en suero o plasma humano. La detección del anticuerpo IgG frente al VHH-7 en humanos puede utilizarse en el diagnóstico de la infección actual del virus y podría proporcionar pruebas serológicas de una infección anterior.

Introducción y resumen de procedimientos de ensayo

El herpesvirus humano 7 (VHH-7) es un virus linfotrófico humano ubicuo identificado en 1990 a partir de los linfocitos T de un individuo sano (2). Clasificado como miembro de la familia de los herpesvirus humanos, el VHH-7 está estrechamente relacionado con el VHH-6 y el HCMV (1, 7). Al igual que el VHH-6, el VHH-7 muestra un tropismo por los linfocitos T y ha logrado propagarse en una línea continua de linfocitos T humanos, SupT1 (1). El VHH-7 se ha aislado frecuentemente de la saliva de lo que podemos deducir que la glándula salival puede ser el lugar de replicación del VHH-7 (2, 5, 8).

Los estudios serológicos a través de IFA han revelado que el anticuerpo del VHH-7 es común en la población general (1, 4, 8). La infección primaria del VHH-7 parece ocurrir después de la infección primaria común del VHH-6 antes de alcanzar los 2 años de edad. La prevalencia del anticuerpo del VHH-7 ha demostrado aumentar gradualmente con la edad (1, 8). El VHH-7 se ha asociado con exantema súbito, que como sabemos, es una enfermedad provocada por el VHH-6 (3). No se ha identificado aún ninguna otra asociación con enfermedades.

Necesitamos nuevos estudios para verter luz sobre las características de este virus, como su función etiológica en la enfermedad y epidemiología.

La prueba IFA ha demostrado ser un ensayo eficiente para detectar el anticuerpo IgG frente al VHH-7. La seroconversión o un aumento en 4 veces o incluso superior del anticuerpo IgG en muestras de suero pareadas indican infección actual.

Principio de la prueba

Los ensayos con anticuerpos fluorescentes SCIMEDX utilizan el método indirecto de detección del anticuerpo y la determinación de valoración. Las muestras de suero o plasma de pacientes se aplican a cultivos celulares que contienen antígenos virales inactivos proporcionados en pocillos coloreados sobre portaobjetos de cristal para microscopio. Durante una incubación de 30 minutos, el anticuerpo específico de los antígenos del VHH-7 forma un complejo de antígeno-anticuerpo con los antígenos del VHH-7 en las células infectadas. En un breve proceso de lavado, se eliminan los anticuerpos no específicos y demás proteínas del suero que no hayan reaccionado. A continuación se aplica el IgG antihumano de cabra conjugado con fluoresceína a los pocillos del portaobjetos. El conjugado de anti-IgG se combina con IgG humano, si lo hay, durante una incubación de 30 minutos. Después de un breve lavado para eliminar el conjugado que no haya reaccionado, se observan los portaobjetos a través del microscopio de fluorescencia. Una fluorescencia verde brillante en los antígenos indica una reacción positiva del anticuerpo.

Materiales proporcionados y condiciones de almacenamiento

Portaobjetos de antígeno del VHH-7: los portaobjetos de linfocitos humanos infectados con VHH-7 en cada pocillo de cristal. Los portaobjetos pueden utilizarse a partir del mismo instante que se extraen de la bolsa protectora. Almacene a 2-8°C. Los portaobjetos se mantienen estables en estas condiciones de almacenamiento hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la bolsa.

Control positivo de IgG del VHH-7: cada vial contiene 0,5 ml de control positivo humano del anticuerpo IgG frente al VHH-7. Este componente está preparado para su uso líquido. Almacene a 2-8°C. El control positivo líquido se mantiene estable en estas condiciones de almacenamiento hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

Control negativo de IgG del VHH-7: cada vial contiene 0,5 ml de control negativo humano del anticuerpo IgG frente al VHH-7. Este componente está preparado para su uso. Almacene a 2-8°C. El control positivo líquido se mantiene estable en estas condiciones de almacenamiento hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

Conjugado con fluoresceína: cada vial contiene 1,5 ml de IgG antihumana de cabra (cadena pesada y ligera) conjugada con fluoresceína (inactivada) con contratinación de azul de Evans y rodamina. El conjugado con fluoresceína es un conjugado de IgG antihumana purificada por cromatografía de afinidad con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Si añadimos contratinaciones de azul de Evans y rodamina al conjugado, ocultaremos la fluorescencia no específica de los cultivos celulares de tejidos. Este componente está preparado para su uso líquido. Almacene a 2-8°C. El conjugado de líquido se mantiene estable en estas condiciones de almacenamiento hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

Medios de soporte del cubreobjetos: cada vial contiene 2,0 ml de glicerol tamponado con fosfato con retardante diluido. Este componente está preparado para su uso líquido. La temperatura de almacenamiento puede oscilar desde refrigeración a temperatura ambiente (2-30°C). Los medios de soporte se mantienen en estas condiciones de almacenamiento hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

Salina tamponada con fosfato (PBS): cada paquete sellado y envuelto en aluminio de solución tampón en polvo sirve para un litro de 1 X PBS. La temperatura de almacenamiento puede oscilar desde refrigeración a temperatura ambiente (2-30°C). Añada todos los contenidos de un paquete de PBS a un litro de agua desionizada o destilada preparada recientemente. Nota: añadir las sales mientras se remueve rápidamente el agua facilitará la solubilización. Almacene el PBS como solución a 2-8°C.

Secantes especiales: los secantes absorbentes incorporan orificios perforados para uso en el secado de la máscara del portaobjetos. La temperatura de almacenamiento puede oscilar desde refrigeración a temperatura ambiente (2-30°C).

Precauciones generales

Equipo de prueba de IFA: sin estándar estadounidense de potencia.

- Almacene todos los componentes del equipo a sus temperaturas recomendadas y sugeridas. No congele.
- No utilice los componentes después de la fecha de caducidad indicada en cada componente. •
- SCIMEDX optimiza todos los componentes activos en cada lote de sus equipos de IFA como una unidad completa. No mezcle componentes de diferentes lotes o de distintas fuentes.
- Los controles y conjugados contienen un 0,095% de azida sódica que, si se deja acumular, puede formar componentes explosivos en tuberías de plomo y/o cobre. Purgue completamente si se utiliza para desechar estos materiales.
- Use distintas puntas de pipeta para cada una de las muestras y reactivos para evitar la contaminación cruzada.
- Los reactivos deben inspeccionarse en busca de evidencias de contaminación bacteriana o micótica.

Portaobjetos de antígenos: todos los portaobjetos de antígenos de IFA contienen células fijadas que no contienen ningún agente infeccioso viable. Sin embargo, las buenas prácticas de laboratorio (GLP) exigen una manipulación y desecho cuidadoso de los portaobjetos al igual que con cualquier otro material de laboratorio potencialmente biopeligroso.

- No saque los portaobjetos de su bolsa protectora hasta que vaya a utilizarlos.
- No reutilizar portaobjetos.

Controles humanos: todos los controles humanos de estos equipos han pasado controles del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y del anticuerpo del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) mediante métodos autorizados por la FDA y dichas pruebas han proporcionado resultados no reactivos. Sin embargo, ningún sistema de pruebas puede garantizar la ausencia de estos agentes. Manipule todos los componentes de suero humano, incluyendo los que reciba en su laboratorio para practicar distintos ensayos, como si se tratase de material potencialmente biopeligroso.



Sustancia nociva Xn Precauciones de seguridad del control y del conjugado:

La concentración de azida sódica en estos componentes está clasificada como Nociva y sujeta a la siguiente frase de riesgo: "Nocivo en caso de ingestión. En contacto con ácidos libera gases tóxicos".

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

Muestreo y almacenamiento y limitaciones de las muestras

- Separe asépticamente el suero o plasma recogido de los glóbulos rojos y almacene congelado (-10°C o menos) hasta que esté preparado para realizar el ensayo. Evite repetir el proceso de congelación y descongelación.
- Si lo desea, almacene las muestras líquidas frescas de suero o plasma a intervalo de 2° a 8° durante una semana sin pérdida de actividad de anticuerpos. • No utilice excesivamente muestras lipídicas sin delipidación.
- No utilice muestras contaminadas.
- Tome muestras de suero pareadas para demostrar la seroconversión o un aumento significativo de la valoración a los 7-14 días, almacénelas y, a continuación, realice pruebas simultáneamente.

Materiales adicionales necesarios

- Probetas, gradillas, pipetas, placas de microvaloración y dispositivos de pipeteo de seguridad para realizar diluciones de muestras • Incubador a 37°C
- Cámara húmeda para incubar portaobjetos • Gradilla de portaobjetos y plato de tinción para portaobjetos de lavado
- Cubreobjetos: cristal de 22 X 50 mm de grosor nº 1

Microscopio de fluorescencia: para calibrar los controles y conjugados se utiliza un microscopio de fluorescencia. Este microscopio incorpora:

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

La etiqueta de fluoresceína tiene un pico de excitación de 490 nm y un pico de emisión de 520 nm. Las diferencias en reactividades en punto final e intensidades de fluorescencia pueden deberse al tipo y estado del equipo de fluorescencia utilizado en su laboratorio.

Procedimiento de IFA

1. Para la determinación cualitativa del anticuerpo IgG, prepare una dilución de evaluación de 1:20 de cada muestra de ensayo en PBS. Prepare todas las diluciones en un volumen mínimo de 0,10 ml con PBS como diluyente.
2. En caso de valoración cuantitativa de sueros, prepare diluciones seriales dobles de la muestra de suero en PBS, empezando por una dilución de 1:20 y añadiendo volúmenes iguales de suero o plasma diluido y PBS por cada dilución consecutiva.
3. Saque los portaobjetos de la bolsa protectora y aplique 1 gota (aproximadamente 20 µl) de la muestra de ensayo diluida a cada pocillo. Añada un volumen suficiente para cubrir completamente cada pocillo, pero evitando mezclar el contenido entre los pocillos. Nota: cada ronda de pruebas diaria requiere un pocillo para cada control positivo, control negativo y PBS (control de conjugado).
4. Incube los portaobjetos en una cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C.
5. Enjuague los portaobjetos en un flujo ligero de solución tampón. Evite dirigir el flujo a los pocillos.

6. Lave los portaobjetos durante 10 minutos cambiando la solución de PBS después de 5 minutos. Agite los portaobjetos moviendo la gradilla de arriba a abajo en la solución tampón.
7. Seque la máscara de pintura que rodea a los pocillos de ensayo con secantes especiales.
8. Aplique una gota del conjugado preparado a cada pocillo de ensayo.
9. Repita los pasos 4 (incubación), 5 (enjuague de PBS), 6 (lavado de PBS de 10 minutos) y 7 (segundo).
10. Aplique los medios de soporte del glicerol y el cubreobjetos de cristal de 22 X 50 mm
11. Observe la reactividad bajo el microscopio de fluorescencia utilizando una magnificación de 20-40X. Para optimizar los resultados, examine los portaobjetos inmediatamente después de completar el ensayo. Para obtener resultados equivalentes, sella los portaobjetos o manténgalos humidificados para minimizar la deshidratación del medio de soporte, almacene en condiciones de oscuridad a 2-8°C y lea dentro de tres días. La reactividad positiva puede oscilar en intensidad de fluorescencia de brillante a débil. Clasifique la reacción de fluorescencia de acuerdo con la siguiente escala de intensidad: 4+ (brillante), 3+ (fuerte), 2+ (moderada) y 1+ (débil).

Interpretación de los resultados

- La tinción fluorescente verde brillante de las células infectadas denota una reacción positiva del anticuerpo IgG frente al VHH-7. El patrón de tinción fluorescente de las células infectadas de VHH-7 es variable. Dependiendo de la fase de infección de la célula, el patrón fluorescente puede variar de una pequeña porción de célula infectada fluorescente a toda la célula fluorescente. La fluorescencia también puede variar de granular a homogénea. Para proporcionar un control interno, cada pocillo del portaobjetos de microscopio contiene tanto células infectadas con VHH-7 como células no infectadas. El portaobjetos se prepara de esta forma intencionadamente. Las células no infectadas, impregnadas de rojo por contratinación, proporcionan un fondo de contraste. La infeciosidad de las células va del 20% al 60%. La valoración de sueros positivos de IgG frente al VHH-7 proporcionarán información cuantitativa. En series de valoración, la dilución más alta de suero que revele
- La ausencia de tinción fluorescente específica de las células infectadas denota una reacción negativa del anticuerpo IgG frente al VHH-7.

Significancia de la interpretación

1. Fluorescencia no discernible de las células infectadas en la dilución de evaluación.	1. La muestra de ensayo del anticuerpo IgG frente al VHH-7 es negativa.
2. Fluorescencia positiva específica de las células infectadas en la dilución de evaluación o en diluciones más elevadas.	2. La muestra de ensayo del anticuerpo IgG frente al VHH-7 es positiva, indicando infección previa de VHH-7. La seroconversión o un aumento cuádruple o superior en la valoración del anticuerpo en muestras de suero pareadas indica una infección reciente de VHH-7.
3. Fluorescencia en células infectadas y no infectadas.	3. La muestra de ensayo muestra una reacción no específica.

Nota: la ejecución de una prueba específica de anticuerpo IgM frente al VHH-7 facilita el diagnóstico de infección actual de VHH-7.

Control de calidad

1. Para asegurar que el ensayo salga bien, utilice los controles positivo y negativo al menos una vez por cada día de pruebas.
2. El tipo y duración del microscopio de fluorescencia y las horas de uso de la bombilla UV pueden afectar de alguna forma a la intensidad de la fluorescencia y a los puntos finales de valoración. El control positivo del anticuerpo frente al VHH-7 suministrado con este equipo se revela una reacción de intensidad de 3+ a 4+. El vial tiene una valoración indicada para usar como comprobación adicional del sistema de ensayo (consulte la Nota sobre dilución 1+). Utilícelo como calibrador para una reacción de intensidad de 3+ a 4+ en su microscopio.
3. Utilice el control negativo del anticuerpo frente al VHH-7 suministrado con este equipo como calibrador de una reacción negativa de su equipo.
4. Cada prueba diaria debe incluir un pocillo de PBS en lugar de una muestra de ensayo. Se trata de un control de conjugado para garantizar que el conjugado no reaccione con el sustrato celular.

Nota de dilución 1+

El control positivo de este equipo está preparado para su uso líquido para ofrecer una intensidad de fluorescencia de 3+ a 4+ cuando se realiza el ensayo. Para obtener una intensidad fluorescente 1+ realice diluciones dos veces superiores a la valoración indicada en el vial incluido en este paquete. Valore el control positivo con el uso inicial del equipo. La valoración que obtenga en los ensayos puede diferir de la valoración de punto final indicada por numerosas razones técnicas. Es mejor realizar el ensayo con la valoración indicada en el vial, además de la dilución doble inmediatamente antes y después de la valoración indicada. Es normal que los resultados obtenidos para una valoración de punto final (1+) difieran entre laboratorios debido a factores implicados en la intensidad de la fluorescencia. Estos factores incluyen:

1. la potencia nominal de la fuente de luz UV del microscopio
2. el tipo de fuente de luz
3. la antigüedad de la lámpara
4. la longitud de la ruta óptica del microscopio y los tipos de filtros ópticos utilizados
5. la precisión de las técnicas de dilución y del equipo de dilución

Limitaciones del procedimiento

1. Un ensayo serológico como el IFA ayuda a detectar la infección viral, pero su uso no debe tomarse como único criterio. Los resultados del ensayo deben utilizarse en combinación con la información disponible del paciente, de la evaluación clínica y de otros procedimientos de diagnóstico disponibles.
2. Un resultado positivo individual del anticuerpo IgG frente al VHH-7 sólo es significativo cuando indica el contacto o infección previa con el virus. Un único resultado sí que resulta útil para el estudio epidemiológico. Sin embargo, no debe utilizarse como indicativo de infección actual o reciente del virus. Para determinar la infección actual o reciente, practique simultáneamente ensayos de muestras pareadas de plasma o suero tomadas con 7-14 días de distancia. Un aumento en cuatro o más veces de la valoración entre la primera y la segunda muestra es indicativo de una infección actual o reciente.
3. Pueden darse reacciones positivas no específicas como reacciones del anticuerpo antinuclear y/o reacciones del anticuerpo anticitoplasmático en muestras de pacientes con determinadas enfermedades autoinmunes. Tanto las células infectadas como las

no infectadas se mostrarán fluorescentes pudiendo ocultar una reacción positiva del VHH-7. Por lo tanto, la observación de una reacción autoinmune no puede descartar la posibilidad de infección por VHH-7. Características de funcionamiento Sensibilidad relativa y especificidad: el equipo de IFA SCIMEDX fue evaluada frente a un IFA de VHH-7 a la venta en el mercado. Las muestras consistían en sueros retrospectivos congelados. Veintiocho sueros mostraron resultados normales de varias edades, géneros y áreas geográficas. El acuerdo global fue de 27/28 o 96,4%. Consulte la siguiente tabla.

IFA de VHH-7 SCIMEDX

IFA alternativo	Estado del VHH-7	Positivo	Negativo	Total
	Positivo	21	0	21
	Negativo	1	6	7
	Total	22	6	28

Recuerde que "relativo" hace referencia a la comparación de los resultados de este ensayo con los de un ensayo similar. No se ha intentado correlacionar los resultados del ensayo con la presencia o ausencia de enfermedad. No puede sacarse ninguna conclusión de la comparación entre la precisión del ensayo y la enfermedad pronosticada.

Reproductibilidad: se diluyeron ocho sueros positivos con varias valoraciones (1:20-1:160) y tres sueros negativos y se realizaron tres ensayos en cada uno determinando el punto final. Todas las valoraciones entraron en la especificación de ± una dilución doble. Consulte la siguiente tabla.

Valoración idéntica 28/33
± una dilución doble 5/33

Especificidad: el ensayo de IFA para VHH-7 es una prueba específica para detectar anticuerpos frente al VHH-7. Se utilizó el equipo de IFA para realizar ensayos sobre diez sueros positivos para actividad de anticuerpos de enfermedades que tienen una reactividad cruzada potencial al VHH-7. No se observó reactividad cruzada en ninguna de las muestras. La siguiente tabla resume los datos.

Datos de reactividad cruzada – IgG frente al VHH-7 SCIMEDX

Tipo de enfermedad	Muestras totales	Resultado positivo
Citomegalovirus	7	0/7
Virus de Epstein-Barr	10	0/10
Herpesvirus Simplex 1 y 2	9	0/9
Herpesvirus Simplex 6	5	0/5
Herpesvirus Simplex 8	3	0/3
Virus de la varicela-zóster	10	0/10
Total	10	0/10

Estabilidad en tiempo real: las pruebas de estabilidad en tiempo real de los componentes del equipo se realizaron a intervalos de 6 meses durante un mínimo de 24 meses. Las valoraciones de punto final de los controles positivos y negativos se compararon con las valoraciones de punto final en el momento de la emisión. Se tomaron como criterios de aceptación las valoraciones de punto final dentro de una dilución doble de cada uno. Estos resultados entraron dentro de las especificaciones. Consulte la siguiente tabla.

Estabilidad en tiempo real

Lote de portaobjetos	Control	Valoración de punto final en liberación	Valoración de punto final a los 24 meses
#1	Positivo	1:640	1:640
	Negativo	-	-
#2	Positivo	1:320	1:320
	Negativo	-	-
#3	Positivo	1:320	1:320
	Negativo	-	-

 SCIMEDIX CORPORATION
53 Richbenton Rd
Dover, NJ 07801 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8796
www.scimedix.com

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



	Manufactured by Prodotto da Fabricado por Fabriqué par hergestellt von
REF	Catalog number Número de catalogo Número de Catálogo Numéro de catalogue Katalognummer
LOT	Lot Lotto Lote Lot Charge
EC REP	EC Authorized Representative Rappresentante Autorizzato CE Representante Autorizado CE CE Représentant autorisé EG autorisierter Bevollmächtigter
CE	EC Declaration of Conformity Dichiarazione di Conformità CE Declaración de Conformidad CE CE Déclaration de Conformité EG Konformitätserklärung
	Number of tests Número di test Número de determinaciones Nombre de tests Anzahl der Teste
	See instructions for use Vedere le istruzioni per l'uso Consultar la instrucciones de uso Voir instructions Gebrauchsweisung beachten
	Expiration date Data di scadenza Caducidad Date d'Expiration Haltbarkeitsdatum
	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
	Caution Attenzione Precaución Précautions Achtung
	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.
	Potential biological risk Potenziale rischio biologico Riesgo potencial biológico Biohazard Potentielle biologische Gefährdung
RFU	Ready for use Pronto all'uso Listo para su uso Prêt à l'emploi Gebrauchsfertig

	Usage in vitro Für in-vitro diagnostische Verwendung
RUO	For research use only Solo per ricerca Para uso solo en investigación Pour recherche Nur für Forschungszwecke
IUO	For investigational use only Solo per uso investigativo Para uso solo en investigación Pour investigation Nur für Forschungszwecke
PBS	Phosphate Buffered Saline Tampone salino fosfato Fosfato Salino Tamponado Tampon phosphate saline PBS
MS	Mounting Solution, Buffered Glycerol Solutioón de montaje, glicerol tamponné Eindeckmittel, gepuffertes Glycerol Soluzione di montaggio, glicerolo tamponato Solución de montaje, glicerol tamponado
AG SLD	Antigen Slide Lames d'antigène Antigen-Objekträger: Vetrino dell'antigene Portaobjetos de antígeno
FITC	Anti-Human Conjugate with counterstain Conjugué anti-humain avec coloration de contraste Antihuman-Konjugat mit Gegenfärbung Conjugado anti-umano con colorante de contraste Conjugado anti-humano con contratiñación
NEG	Negative Control Controllo Negativo Control Negativo Contrôle negative Negative Kontrolle
POS	Positive Control Controllo Positivo Control Positivo Contrôle positif Positive Kontrolle
CONJ CNS	Counterstain Colorante de contraste Contraste Contrecolorant Gegenfärbung
CS	Coverslip Coprioggetto Cubre portaobjetos Lamelles couvre-objet Deckgläshen
BLT	Blotters Buvards Löschkopier Tamponi di carta assorbente Absorbentes
DIL	Sample Diluent Diluente del campione Diluyente de muestra Tampon de dilution Probenverdünnungslösung

IVD	For in vitro diagnostic use Per uso diagnostico <i>in vitro</i> Para uso solo in vitro
------------	--