

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

EXPORT ONLY

I-HV601G	120 Tests
I-HV602G	40 Tests
I-HV603G	40 Tests

Intended Use

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

Introduction and Summary of Test Procedures

Human herpesvirus 6 (HHV6) is a human lymphotropic virus, first isolated from immunosuppressed individuals and patients with lymphoproliferative disorders. It is a DNA virus, originally named human B-lymphotropic virus (HBLV), now classified as a member of the family of human herpesviruses (1, 2).

HHV6 is genetically and serologically distinct from the other known human herpesviruses (2-4). Serological studies, using the indirect fluorescence assay (IFA), have shown that antibody to the virus is often found in the general population. Primary infection usually occurs before the age of two. A high percentage of humans above the age of one are seropositive for anti-HHV6 antibody (4-6). Primary infection in adults is rare because of the high rate of infection in childhood. While primary infection in healthy adults usually results in mild illness, more serious complications can arise in immunocompromised patients or patients undergoing organ or bone marrow transplantation (4).

HHV6 has been identified as the causative agent of roseola infantum, also known as exanthem subitum. The virus has been isolated from children with exanthem subitum and the association further supported by serologic studies (7-9).

Roseola infantum is considered a benign non-seasonal disease of childhood with clinical indications of rash and fever. Infants are protected by maternal antibodies so that infection is most frequent between 6 and 18 months of age. Serological information is valuable in diagnosis since detection of antibody by the IFA technique is both sensitive and specific, without cross-reaction to other human herpesviruses (3, 5, 10, 11-13).

Principle of the Test

SCIMEDX fluorescent antibody assays use the indirect method of antibody detection and titer determination. Patient serum or plasma samples are applied to cultured cells containing inactivated viral antigens provided on paint delineated wells on glass microscope slides. During a 30 minute incubation, antibody specific for HHV6 antigens forms an antigen/antibody complex with the HHV6 antigens in the infected cells. In a brief washing step, nonspecific 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

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

HHV6 IgG Positive Control: Each vial contains 0.5 ml HHV6 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.

HHV6 IgG Negative Control: Each vial contains 0.5 ml HHV6 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 Prevention:
Pictogram		<ul style="list-style-type: none"> • Wash thoroughly after handling. • Wear eye/face protection
Signal Word	WARNING	<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.
Hazard Statement	Causes serious eye irritation.	<ul style="list-style-type: none"> • Dispose of content and/or container in accordance with local, regional, national, and/or international regulations.

EU

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

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 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 HHV6 IgG antibody positive reaction. The fluorescent staining pattern of HHV6 infected cells is variable. Depending on the cell's stage of infection, the fluorescent pattern can vary from a small portion of the infected cell fluorescing to the whole cell fluorescing. Fluorescence can

also range from granular to homogeneous. To provide an internal control, each well on the microscope slide contains both HHV6 infected and uninfected cells. Preparation of the slide in this manner is intentional. Uninfected cells, stained red by the counterstain, provide a contrasting background. Infectivity of the cells ranges from 20% - 60%. Titration of positive HHV6 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 HHV6 IgG antibody negative reaction.

Significance of Interpretation

1. No discernible fluorescence of the infected cells found at the screening dilution.	1. Test sample is HHV6 IgG antibody negative.
2. Specific positive fluorescence of the infected cells found at the screening dilution or at higher dilutions.	2. Test sample is HHV6 IgG antibody positive, indicating previous HHV6 infection. Seroconversion or a four-fold or greater rise in IgG antibody titer in paired serum samples indicates recent infection with HHV6.
3. Fluorescence found in both infected and uninfected cells.	3. Test sample is exhibiting a nonspecific reaction.

Note: Performance of a HHV6 IgM antibody specific test aids in the diagnosis of a current HHV6 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 HHV6 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 HHV6 antibody negative control furnished with this kit as the calibrator for a negative reaction on your equipment.
- Each day's test should include one PBS well in place of a test sample. This is a conjugate control to ensure the conjugate is not reacting with the cell substrate.

1⁺ Dilution Notice

The positive control in this kit is ready for 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 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 HHV6 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 HHV6 reaction. Therefore, observation of an autoimmune reaction cannot eliminate the possibility of HHV6 infection.

Expected Values

A high percentage of humans above the age of one are seropositive for anti-HHV6 antibody (4-6). Studies using the IFA method indicate prevalence rates of 80-95% in older children and adults in the general population. No significant differences in prevalence rates due to geographical location have been reported.

Performance Characteristics

Relative Sensitivity and Specificity: The SCIMEDX HHV6 IFA kit was evaluated relative to a commercially available HHV6 IFA. The samples were frozen retrospective sera. Fifty-seven sera were from donors with known HHV6 infection. Twenty-three sera were from normals of various ages, both genders and geographical areas. The overall agreement was 76/80 or 95.0%. Refer to the following table.

SCIMEDX HHV6 IFA

Alternate IFA	HHV6 Status	Positive	Negative	Total
	Positive	57	1	58
	Negative	3	19	22
	Total	60	20	80

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: Ten positive sera with various titers (1:20-1:640) and five negative serum were serially diluted and assayed three times each and the endpoint determined. Forty-four of the endpoint titers were within the specifications of \pm one two-fold dilution. Refer to the following table.

Identical Titer	39/45
\pm one, two-fold dilution	5/45
\pm two, two-fold dilutions	1/45

Specificity: Thirty-four sera positive for antibody activity to diseases that have the potential for cross-reactivity to HHV6 were tested on this IFA kit. Because of the prevalence of HHV6 in patients worldwide, cross-reactivity was observed. The table below summarizes the data.

Cross Reactivity Data-SCIMEDX HHV6 IgG

Disease Type	Total Samples	Positive Result
Cytomegalovirus	18	11/18
Epstein-Barr virus	32	24/32
Herpes Simplex virus 1	26	17/26
Herpes Simplex virus 7	22	18/22
Varicella Zoster virus	10	5/10
Total	34	24/34

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 table below.

Real Time Stability

Slide Lot	Control	Endpoint Titer at Release	Endpoint Titer at 24 months
#1	Positive	1:1280	1:1280
	Negative	-	-
#2	Positive	1:640	1:320
	Negative	-	-
#3	Positive	1:640	1:640
	Negative	-	-

Literature Cited

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

 SCIMEDX CORPORATION
53 Richbonton 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 FLUORESCENCE INDIRECT SPECIFIQUE A L'ANTICORPS IgG ANTI- HUMAN HERPESVIRUS 6 (HHV6)

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

I-HV601G	120 Tests
I-HV602G	40 Tests
I-HV603G	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 6 (HHV6) est conçu pour la détection qualitative et semi quantitative de l'anticorps anti-IgG (Immunoglobuline G) du HHV6 dans le sérum ou le plasma humains. La détection de l'anticorps anti-IgG du HHV6 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

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

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

Le HHV6 a été identifié comme étant l'agent causal de la roséole infantile, également appelée exanthème subit. Le virus a été isolé chez des enfants présentant un exanthème subit et cette association a été ensuite corroborée par des examens sérologiques (7-9).

La roséole infantile est considérée comme une maladie infantile non saisonnière bénigne dont les symptômes cliniques sont des éruptions cutanées et de la fièvre. Les nourrissons sont protégés par les anticorps maternels de sorte que l'infection est plus fréquente entre 6 et 18 mois. Les données sérologiques permettent de poser le diagnostic car la détection de l'anticorps par la technique de l'IFA est à la fois sensible et spécifique, sans réaction croisée avec d'autres virus de l'herpès humain (3,5,10,11-13).

Principe du test

Les essais par fluorescence sur l'anticorps de SCIMEDX Corp. utilisent la méthode indirecte de détection de l'anticorps et de détermination du titre. Les échantillons de sérum ou de plasma des patients sont appliqués sur 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-HHV6 forme un complexe antigène/anticorps avec les antigènes anti-HHV6 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 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 actif, les lames sont observées au microscope à fluorescence. Une réaction positive à l'anticorps est indiquée par une fluorescence verte brillante sur les sites de l'antigène.

Matériels fournis et conditions de conservation

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

Contrôle positif aux IgG du HHV6 : Chaque flacon contient 0,5 ml de contrôle humain positif à l'anticorps anti-IgG du HHV6. 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 HHV6 : Chaque flacon contient 0,5 ml de contrôle humain négatif à l'anticorps anti-IgG du HHV6. 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 pré découpés 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'immodéficience humaine (VII) 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 sanguins 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.
Mot de signal	ATTENTION	
Mention de danger	H319 Provoque une sévère irritation des yeux.	P337+P313 Si l'irritation

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 soyiez 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 sanguins apparus 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
 - Néatoscope 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 1:20 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 sanguins, préparer des dilutions en série à deux volumes des échantillons de sérum dans du PBS, en commençant par une dilution à 1:20, 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 glycérrol 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 HHV6. Le schéma de fluorescence des cellules infectées par le HHV6 est variable. Selon le niveau d'infection des cellules, le schéma fluorescent peut varier d'une fluorescence touchant un faible nombre de cellules infectées à une fluorescence de toutes les cellules. La fluorescence peut également présenter divers aspects, de granulaire à homogène. Pour fournir un contrôle interne, chaque puits de la lame de microscope contient à la fois des cellules infectées par le HHV6 et non infectées. La préparation de la lame de cette manière est intentionnelle. Les cellules non infectées, colorées en rouge par le contre-colorant, fournissent une coloration de contraste. L'infectivité des cellules est comprise entre 20 et 60 %. Le tirage des échantillons sériques d'IgG du HHV6 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 HHV6.

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 HHV6.
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 HHV6, 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 HHV6.
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 HHV6 facilite le diagnostic d'infection au HHV6 en cours.

Contrôle qualité

1. Pour garantir le bon fonctionnement du test, utiliser les contrôles positif et négatif au moins une fois par jour de test.
2. Le type et l'ancienneté du microscope à fluorescence et le nombre d'heures d'utilisation de l'ampoule UV peuvent affecter, dans une certaine mesure, l'intensité de la fluorescence et les résultats finaux de titrage. Le contrôle positif à l'anticorps anti-HHV6 fourni avec ce kit est embouteillé qui présente une réaction d'intensité 3⁺ 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 3⁺ à 4⁺ sur votre microscope.
3. Utiliser le contrôle négatif à l'anticorps anti-HHV6 fourni avec ce kit comme étalon pour une réaction négative sur votre équipement.
4. 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 3⁺ à 4⁺ lors de l'analyse. Pour obtenir une intensité de fluorescence de 1⁺, réaliser des dilutions à deux volumes du titre indiqué sur le flacon inclus dans ce kit. Titrer le contrôle positif lors de la première utilisation du kit.

Le titre obtenu lors de l'analyse peut différer 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 :

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

Limites de la procédure

1. 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.
2. Un résultat positif isolé pour l'anticorps anti-IgG du HHV6 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 les réactions des anticorps antinucléaire et/ou anti-cytoplasmique peuvent se produire dans des échantillons de patients présentant certaines maladies auto-immunes. Les cellules infectées comme les cellules non infectées sont alors fluorescentes, ce qui peut masquer une réaction positive au HHV6. Par conséquent, l'observation d'une réaction auto-immune ne peut éliminer la possibilité d'une infection par le HHV6.

Valeurs attendues

Un pourcentage élevé de sujets de plus d'un an est séropositif aux anticorps anti-HHV6 (4-6). Des études utilisant la méthode IFA indiquent des taux de prévalence de 80 à 95 % chez l'enfant plus âgé et chez l'adulte dans la population générale. Aucune différence significative des taux de prévalence liée à la zone géographique n'a été rapportée.

Caractéristiques de performance

Sensibilité et spécificité relatives : Le kit HHV6 IFA de SCIMEDX Corp. a été évalué par rapport à un autre kit HHV6 IFA disponible dans le commerce. Les échantillons étaient d'anciens prélevements de sérum congelés. Cinquante-sept échantillons de sérum provenaient de sujets chez lesquels l'infection au HHV6 était connue. Vingt-trois des échantillons étaient normaux à divers âges, chez les deux sexes et quelle que soit la zone géographique. La concordance globale était de 76/80, soit 95,0 %. Voir le tableau suivant.

HHV6 IFA de SCIMEDX

Autre IFA	Etat HHV6	Positif	Négatif	Total
	Positif	57	1	58
Négatif	3	19	22	
Total	60	20	80	

Veuillez noter que les valeurs « relatives » font référence à la comparaison des résultats de l'essai à ceux obtenus lors d'un essai similaire. L'objectif n'était pas de corrélérer les résultats du test et la présence ou l'absence de maladie. Il n'est pas possible de déterminer si le sujet est atteint en se basant sur la précision des essais comparatifs.

Reproductibilité : Dix échantillons de sérum positifs à divers titres (de 1:20 à 1:640) et cinq échantillons de sérum négatifs ont été dilués en série et analysés trois fois chacun afin de déterminer le résultat final. Quarante-quatre des titres finaux s'inscrivaient dans la plage de ± une dilution à deux volumes. Voir le tableau suivant.

Titre identique	39/45
± une dilution à deux volumes	5/45
± deux dilutions à deux volumes	1/45

Spécificité : Trente-quatre échantillons de sérum positifs à l'activité de l'anticorps pour des maladies susceptibles de montrer une réactivité croisée au HHV6 ont été analysés avec ce kit IFA. En raison de la prévalence du HHV6 chez l'homme dans le monde, une réactivité croisée a été observée. Le tableau ci-dessous résume ces données.

Données sur la réactivité croisée - Test IgG HHV6 de SCIMEDX

Type de maladie	Nombre d'échantillons	Résultat positif
Cytomégalovirus	18	11/18
Virus d'Epstein-Barr	32	24/32
Virus de l'herpès simplex 1	26	17/26
Virus de l'herpès simplex 7	22	18/22
Virus varicelle-zona	10	5/10
Total	34	24/34

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

Lot de lames	Contrôle	Titre final lors de la libération	Titre final à 24 mois
#1	Positif	1:1280	1:1280
	Négatif	-	-
#2	Positif	1:640	1:320
	Négatif	-	-
#3	Positif	1:640	1:640
	Négatif	-	-

Bibliographie

1. Salahuddin, A.K., D.V. Abashli, P.D. Markham, S.F. Josephs, S. Sturzenegger, M. Kaplan, G. Halligan, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, B. Kramarsky, and R.C. Gallo. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 234:596-601.
2. Josephs, S.F., S.Z. Salahuddin, D.V. Abashli, F. Schacter, F. Wong-Staal, and R.C. Gallo. 1986. Genomic analysis of the human B-lymphotrophic virus (HBLV). *Science*. 234:1601-603.
3. Abashli, D.V., S.F. Josephs, A. Buchbinder, K. Hellman, S. Nakamura, T. Ullana, P. Lusso, M. Kaplan, J. Dahlberg, S. Memon, F. Imam, K.L. Abashli, P.D. Markham, B. Kramarsky, G.R.F. Krueger, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, S.Z. Salahuddin, and R.C. Gallo. 1988. Human B-lymphotrophic virus (human herpesvirus 6). *J. Virol. Methods*. 21:29-48.
4. Stewart, J.A. 1990. Human herpesvirus 6: basic biology and clinical associations. In *L.M. de la Maja and E.M. Peterson (ed.), Medical virology*, Vol. 9. Plenum Press, New York.
5. Linde, A., H. Dahl, B. Wahren, E. Fridell, Z. Salahuddin, and P. Biberfeld. 1988. IgG antibodies to human herpesvirus 6 in children and adults both in primary Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections. *J. Virol. Methods*. 21:117-123.
6. Briggs, M., J. Fox, and R.S. Tedder. 1988. Age prevalence of antibody to human herpesvirus 6. *Lancet*. i:396.
7. Yamanishi, K., T. Okuno, K. Shiraki, M. Tarahashi, T. Kando, Y. Asano, and T. Kurata. 1988. Identification of human herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. i:1065-1067.
8. Takahishi, K., S. Smuda, K. Kawakami, K. Migata, T. Oki, and T. Nagata. 1988. Human herpesvirus 6 and exanthem subitum. *Lancet*. i:1463.
9. Ueda, K., K. Kusuvara, M. Hirase, K. Okada, C. Migajiki, K. Tokugawa, M. Nakagama, and K. Yamanishi. 1989. Exanthem subitum and antibody to human herpesvirus 6. *J. Infect. Dis.* 159:750-752.
10. Irving, W.L., and A.L. Cunningham. 1990. Serological diagnosis of infection with human herpesvirus type 6. *Br. Med. J.* 300:158-159.
11. Linnavuori, K., H. Peltola, and T. Hovi. 1992. Serology versus clinical signs or symptoms and main laboratory findings in the diagnosis of exanthem subitum (roseola infantum). *Pediatrics*. 89:103-106.
12. Prucksanonda, P., C.B. Hall, R.A. Insul, K. McIntyre, P.E. Pellett, C.E. Long, K.C. Schnabel, P.H. Pincus, R.P. Stamey, T.R. Dambough, and J.A. Stewart. 1992. Primary human herpesvirus 6 infections in young children. *N. Engl. J. Med.* 326:1445-1450.
13. Hall, C.B., C.E. Long, K.C. Schnabel, M.T. Caserta, K.M. McIntyre, M.A. Costanzo, A. Knott, S. Dewhurst, R.A. Insul, and L.G. Epstein. 1994. Human herpesvirus 6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N. Engl. J. Med.* 331:432-438.

 SCIMEDX CORPORATION
53 Richboyton 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 HUMAN HERPESVIRUS 6 (HHV6) IgG-ANTIKÖRPER

Nur zum Export bestimmt

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

I-HV601G	120 Tests
I-HV602G	40 Tests
I-HV603G	40 Tests

Verwendungszweck

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

Einführung und Übersicht über die Testverfahren

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

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

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

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

Testprinzip

Die Immunfluoreszenz-Antikörpertests von SCIMEDX Corp. verwenden die indirekte Methode zum Nachweis von Antikörpern und zur Titerbestimmung. Patientenserum- oder Plasmaproben werden in Zellkulturen mit inaktivierten Viren-Antigenen gegeben, die sich in farbmarkierten Kavitäten auf Glas-Objekträgern befinden. Während der Inkubationszeit von 30 Minuten bilden für HHV6-Antigene typische Antikörper einen Antigen-/Antikörperkomplex mit den HHV6-Antigenen in den infizierten Zellen. Unspezifische Antikörper und andere freie Serumproteine werden in einem kurzen Waschvorgang entfernt. Fluoreszein-konjugiertes Antihuman-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

HHV6-Antigen-Objekträger: Objekträger mit menschlichen Lymphozyten, die mit HHV6 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 Beutel etiketteten angegebenen Verfallsdatum stabil.

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

HHV6 IgG-negative Kontrolle: Jedes Fläschchen enthält 0,5 ml HHV6 IgG-Antikörper-negative Humankontrolle. 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 (schwarze und leichte Kette) mit Evans Blue- und Rhodamin-Gegenfärbung. Das Fluoreszein-Konjugat ist eine Konjugation aus mithilfe von Affinitätschromatographie gereinigtem Antihuman-IgG und Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC). Durch Hinzufügen von Evans Blue- und Rhodamin-Gegenfärbung zum Konjugat wird die nicht spezifische Fluoreszenz der Gewebekulturzellen maskiert. 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. 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 Hinzugetragen der Salze erleichtert die Solubilisierung. PBS-Lösung bei 2-8 °C aufbewahren.

Spezielles Löschkäppchen: Saugfähiges Löschkäppchen 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 Immunschwächerivirus (HIV) getestet und für nicht reaktiv befunden. Kein Testsystem kann jedoch die Abwesenheit dieser Erreger garantieren. Daher sind alle Humanserumkomponenten, einschließlich der Proben, die Ihr Labor zum Testen erhält, als potenzielle biologische Gefahrstoffe zu handhaben.

Xn – gefährlicher Stoff

Sicherheitsvorkehrungen für Kontrollen und Konjugat:

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

Komponente	CS001 PBS Powder Packets	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	H319 Verursacht schwere Augenreizung.
Gefahrenhinweis		P337+P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

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-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 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

1. Für einen qualitativen IgG-Antikörper-Nachweis eine Screening-Lösung im Verhältnis 1:20 für jede Probe in phosphatgepuffter Kochsalzlösung herstellen. Alle Verdünnungen in einem Mindestvolumen von 0,10 ml mit phosphatgepuffter 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 Löschkäppchen abtupfen.
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 (Abtupfen) wiederholen.
10. Das Glycerol-Eindeckmittel und das Deckglas (22 x 50 mm) anbringen.

11. Die Reaktivität bei 20- bis 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 Eideckmittels 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 Intensitätskala bewerten: 4⁺ (intensiv), 3⁺ (leuchtend), 2⁺ (mäßig), 1⁺ (schwach).

Auswertung der Ergebnisse

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

Bedeutung der Auswertung

1. Keine feststellbare Fluoreszenz der infizierten Zellen mit der Screening-Lösung	1. Probe ist HHV6 IgG-Antikörper-negativ.
2. Spezifische positive Fluoreszenz der infizierten Zellen mit der Screening-Lösung oder bei höheren Verdünnungen	2. Probe ist HHV6 IgG-Antikörper-positiv. Dies weist auf eine zurückliegende HHV6-Infektion hin. Eine Serokonversion bzw. ein mindestens vierfach höherer Anstieg im IgG-Antikörper-Titer bei Serumprobenpaaren weist auf eine kürzlich erfolgte Infektion mit HHV6 hin.
3. Fluoreszenz sowohl bei infizierten als auch nicht infizierten Zellen	3. Die Probe weist eine unspezifische Reaktion auf.

Hinweis: Die Durchführung eines HHV6 IgM-Antikörper-spezifischen Tests unterstützt die Diagnose einer frischen HHV6-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 Titrierungs-Endpunkte bis zu einem gewissen Grad beeinflussen. Die in diesem Kit enthaltene HHV6-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⁺ zu 4⁺ Intensitätsreaktion auf Ihrem Mikroskop zu verwenden.
- Die im Kit enthaltene HHV6-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 in diesem Kit enthaltene positive Kontrolle ist gebrauchsfertig und liefert beim Testen eine Intensitätsreaktion von 3⁺ bis 4⁺ aufweist. 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.:

- 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 HHV6 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 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.
- Unspezifische positive Reaktionen wie z. B. antinukleäre und/oder antizyttoplasmatische Antikörperereaktionen können in Proben von Patienten mit bestimmten Autoimmunerkrankungen auftreten. Sowohl infizierte als auch nicht infizierte Zellen fluoreszieren. Dies kann eine positive HHV6-Reaktion verdecken. Daher schließt das Auftreten einer Autoimmunreaktion nicht die Möglichkeit einer HHV6-Infektion aus.

Referenzwerte

Ein hoher Anteil der menschlichen Population im Alter von über einem Jahr ist seropositiv für Anti-HHV6-Antikörper. (4-6) Studien mit der IFA-Methode ergaben Prävalenzen von 80 bis 95 % bei älteren Kindern und Erwachsenen in der allgemeinen Population. Es wurden keine

signifikanten Unterschiede in auf dem geographischen Standort beruhenden Prävalenzen festgestellt.

Leistungscharakteristika

Relative Sensitivität und Spezifität: Das HHV6 IFA-Kit von SCIMEDX Corp.. wurde im Vergleich mit einem im Handel erhältlichen HHV6 IFA-Kit bewertet. Die Proben waren eingefrorene retrospektive Seren. Siebenundfünfzig Seren stammten von Probanden mit bekannter HHV6-Infektion. Dreizehnundzwanzig Seren stammten von normalen Personen unterschiedlichen Alters, Geschlechts und geographischer Herkunft. Die Gesamt-Ubereinstimmung betrug 76/80 bzw. 95,0 %. Siehe folgende Tabelle.

SCIMEDX HHV6 IFA

	HHV6-Status	Positiv	Negativ	Gesamt
Alternativer IFA-Test	Positiv	57	1	58
	Negativ	3	19	22
	Gesamt	60	20	80

Bitte beachten Sie, 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: Zehn positive Seren mit verschiedenen Titern (1:20-1:640) und fünf negative Seren wurden nacheinander verdünnt und jede Probe wurde dreimal getestet und der Endpunkt bestimmt. Vierundvierzig der Endpunkt-Titer lagen innerhalb der Spezifikationen für ± eine zweifache Verdünnung. Siehe folgende Tabelle.

Identischer Titer	39/45
± eine zweifache Verdünnung	5/45
± zwei zweifache Verdünnungen	1/45

Spezifität: Vierunddreißig Seren, die eine positive Reaktion auf Antikörper gegen Krankheiten aufwiesen, die möglicherweise eine Kreuzreaktion mit HHV6 aufweisen können, wurden mit dem IFA-Kit getestet. Aufgrund der Prävalenz von HHV6 bei Patienten weltweit wurde eine Kreuzreakтивität beobachtet. Die untenstehende Tabelle enthält eine Zusammenfassung der Daten.

Daten zur Kreuzreakтивität: SCIMEDX HHV6 IgG-Test

Art der Erkrankung	Proben gesamt	Positives Ergebnis
Zytomegalievirus	18	11/18
Epstein-Barr-Virus	32	24/32
Herpes Simplex-Virus 1	26	17/26
Herpes Simplex-Virus 7	22	18/22
Varicella-Zoster-Virus	10	5/10
Gesamt	34	24/34

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

Objekträger-Charge	Kontrolle	Anfänglicher Endpunkt-Titer	Endpunkt-Titer nach 24 Monaten
Nr. 1	Positiv	1:1280	1:1280
	Negativ	-	-
Nr. 2	Positiv	1:640	1:320
	Negativ	-	-
Nr. 3	Positiv	1:640	1:640
	Negativ	-	-

Literaturnachweis

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

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

EC	REP
----	-----

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





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

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

I-HV601G	120 Tests
I-HV602G	40 Tests
I-HV603G	40 Tests

Uso previsto

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

Introduzione e riepilogo delle procedure d'analisi

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

HHV6 si differenzia geneticamente e sierologicamente dagli altri herpesvirus umani noti (2-4). Studi sierologici, effettuati tramite il saggio a fluorescenza indiretta (IFA), hanno dimostrato che l'anticorpo contro il virus è frequente nella popolazione generale. L'infezione primaria ha luogo generalmente prima del secondo anno di vita. Un'elevata percentuale di individui di età superiore a un anno risulta seropositiva all'anticorpo anti-HHV6 (4-6). L'infezione primaria negli adulti è rara a causa dell'elevato tasso di infezione nell'infanzia.

Mentre negli adulti sana l'infezione primaria provoca generalmente un leggero malessere, complicazioni più gravi possono insorgere in pazienti immunocompromessi o soggetti a trapianto di organi o midollo osseo (4). L'HHV6 è stato identificato come agente responsabile della rosolia infantile, chiamata anche exanthem subitum. Il virus è stato isolato da bambini affetti da exanthem subitum e l'associazione è stata ulteriormente supportata da studi sierologici (7-9).

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

Principio del test

I saggi con anticorpo fluorescente SCIMEDX Corp. usano il metodo indiretto per il rilevamento degli anticorpi e la determinazione del titolo. I campioni di siero o di plasma del paziente sono aggiunti alle cellule in coltura contenenti gli antigeni virali inattivati e fissate su pozzetti, distinguibili grazie alla maschera, su vetrini per microscopio. Durante un'incubazione di 30 minuti, l'anticorpo specifico per gli antigeni dell'HHV6 forma un complesso antigeno/anticorpo con gli antigeni dell'HHV6 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 umane 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 HHV6: vetrini con linfociti umani infettati da HHV6 su ogni pozzetto. Una volta tolti dal sacchetto di protezione, i vetrini sono pronti per l'uso. Conservare a 2-8°C; in questa condizione di conservazione i vetrini sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del sacchetto.

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

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

Coniugato con fluoresceina: ogni fiala contiene 1,5 ml di IgG antiumana (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 componente è un liquido pronto per l'uso. Conservare a 2-8 °C; in questa condizione di conservazione il coniugato liquido è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala.

Mezzo di montaggio per vetrino coprioggetto: ogni fiala contiene 2,0 ml di glicerolo in tampone fosfato con ritardante della 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 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. 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

I-HV601G Printed in U.S.A Rev C 5/4/18

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 crociata.
- 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 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 materiale a potenziale rischio biologico.

Xn - Sostanza nociva

Precauzioni di sicurezza per i controlli e il coniugato

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

Componente	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Consiglio di prudenza Prevenzione:
Pittogramma		P264 Lavare accuratamente ... dopo l'uso. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
AVVERTENZA	ATTENZIONE	Risposta: P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: H319 Provoca grave irritazione oculare.
Indicazione di Pericolo		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.

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 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 sieroconversione 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 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 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. 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).
4. Incubare i vetrini in una camera umida per 30 minuti a 37°C.
5. Risciaccquare 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 infette con una fluorescenza verde luminosa indica una reazione positiva per gli anticorpi IgG anti-HHV6. Il pattern di colorazione fluorescente delle cellule infette con HHV6 è variabile. In base allo stadio di infezione della cellula, il pattern fluorescente può variare dalla fluorescenza di una piccola porzione della cellula infetta alla fluorescenza dell'intera cellula infetta. La fluorescenza può anche variare da granulare a omogenea. Per fornire un controllo interno, ogni pozzetto del vetrino per microscopio contiene sia cellule infette che non infette con HHV6. La preparazione del vetrino in questo modo è intenzionale. Le cellule non infette, colorate di rosso con colorante di contrasto, forniscono un background del contrasto. L'infettività delle cellule varia dal 20% al 60%. La titolazione dei sieri positivi per IgG anti-HHV6 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 infette indica una reazione negativa per gli anticorpi IgG anti-HHV6.

Importanza dell'interpretazione

1. Non si riscontra alcuna fluorescenza distinguibile delle cellule infette alla diluizione di analisi.	1. Il campione del test è negativo per gli anticorpi IgG anti-HHV6.
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-HHV6 indicando la precedente infezione con HHV6. 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 HHV6.
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 anti-HHV6 aiuta nella diagnosi di un'infezione da HHV6 in corso.

Controllo di qualità

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

Nota per la diluizione 1⁺

Il controllo positivo in questo kit è fornito pronto per l'uso e fornisce 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 dalla diluizione indicata per varie ragioni tecniche. È meglio testare il titolo indicato sulla fiala e anche la doppia diluizione subita 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.

Limits 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 anti-HHV6 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.
3. Nei campioni di pazienti con alcune malattie autoimmuni si possono verificare reazioni non specifiche, quali reazioni degli anticorpi antinucleari e/o reazioni degli anticorpi anticitoplasmatici. Sia le cellule infette che quelle non infette possono presentare fluorescenza, nascondendo una reazione positiva per l'HHV6. Ne consegue che l'osservazione di una reazione autoimmune non può eliminare la possibilità di infezione dell'HHV6.

Valori attesi

Un'elevata percentuale di individui di età superiore ad un anno risulta sieropositiva all'anticoe anti-HHV6 (4-6). Studi effettuati con il metodo IFA indicano tassi di prevalenza dell'80-95% in bambini più grandi e in adulti appartenenti alla popolazione generale. Non sono state riportate differenze significative nei tassi di prevalenza in base alla collocazione geografica.

Caratteristiche prestazionali

Sensibilità e specificità relativa: il kit IFA per la determinazione degli anticorpi HHV6 SCIMEDX Corp. è stato valutato rispetto a un test IFA per la determinazione degli anticorpi HHV6 disponibile sul mercato. I campioni erano sieri retroattivi congelati. Cinquantasette sieri provenivano da donatori con infezione da HHV6 nota. Ventitré sieri provenivano da individui sani di varie età, genere e area geografica. La concordanza totale era 76/80 o del 95,0%. Consultare la tabella seguente.

IFA SCIMEDX HHV6				
IFA alternativo	Stato HHV6	Positivo	Negativo	Totale
	Positivo	57	1	58
	Negativo	3	19	22
	Totale	60	20	80

Si deve notare che "rispetto a" è riferito al confronto dei risultati di questo saggio con quelli di un saggio simile. Non si è cercato 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: dieci sieri positivi con vari titoli (1:20-1:640) e cinque sieri negativi sono stati diluiti serialmente e testati tre volte ognuno ed è stato determinato l'endpoint. Quarantaquattro titoli di endpoint erano all'interno delle specifiche di ± una doppia diluizione. Consultare la tabella seguente.

Titolo identico	39/45
± una, doppia diluizione	5/45
± due, doppia diluizione	1/45

Specificità: Con questo kit IFA, sono stati testati trentaquattro sieri positivi per l'attività anticorpale verso le malattie che possono dare reattività crociata con l'HHV6. La reattività crociata è stata osservata come conseguenza della prevalenza di HHV6 nella popolazione mondiale. La tabella seguente riepiloga i dati.

Dati di reattività crociata - IgG anti-HHV6T SCIMEDX		
Tipo di malattia	Totale Campioni	Positivo Risultato
Citomegalovirus	18	11/18
Virus di Epstein-Barr	32	24/32
Virus dell'herpes simplex di tipo 1	26	17/26
Virus dell'herpes simplex di tipo 7	22	18/22
Virus della varicella-zoster	10	5/10
Totale	34	24/34

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	1:1280	1:1280
	Negativo	-	-
#2	Positivo	1:640	1:320
	Negativo	-	-
#3	Positivo	1:640	1:640
	Negativo	-	-

Riferimenti bibliografici citati

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

 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





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

Sólo para exportación

Para uso diagnóstico *in vitro*.

I-HV601G	120 Tests
I-HV602G	40 Tests
I-HV603G	40 Tests

Uso previsto

El ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA) para la detección de anticuerpos IgG contra el antígeno del herpesvirus humano 6 (HHV6) de SCIMEDX se utiliza para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos IgG (inmunoglobulina G) contra HHV6 en suero o plasma humano. La detección de anticuerpos IgG contra el HHV6 en seres humanos puede utilizarse como ayuda en el diagnóstico de la infección primaria, o de la reactivación del virus o reinfección con el mismo.

Introducción y resumen de los procedimientos del ensayo

El herpesvirus humano 6 (HHV6) es un virus humano linfofítico, aislado por primera vez en individuos immunosuprimidos y pacientes con trastornos linfoproliferativos. Es un virus con DNA, llamado originalmente virus linfofítico de células B humanas (HBLV), clasificado actualmente como miembro de la familia de los herpesvirus humanos (1,2).

El HHV6 es genéticamente y serológicamente diferente de otros herpesvirus humanos conocidos (2-4). Estudios serológicos que utilizan ensayos de fluorescencia indirecta (IFA) demostraron que la población general presenta frecuentemente anticuerpos contra el virus. La infección primaria suele producirse antes de los dos años de edad. Un alto porcentaje de individuos mayores de un año son seropositivos en anticuerpos anti-HHV6 (4-6). La infección primaria en adultos es poco frecuente debido al alto índice de infección en la infancia. La infección primaria en adultos sanos suele provocar una enfermedad leve, pero pueden surgir complicaciones más serias en pacientes immunocomprometidos o en pacientes sometidos a trasplante de órganos o médula ósea (4).

El HHV6 ha sido identificado como agente causal de la roseola infantil, también conocida como exantema súbito. El virus se ha aislado en niños con exantema súbito y esta asociación es apoyada por sendos estudios serológicos (7-9).

La roseola infantil se considera una enfermedad infantil benigna no estacional que se manifiesta clínicamente con erupción y fiebre. Los lactantes están protegidos por los anticuerpos maternos, de modo que la infección es más frecuente entre los 6 y los 18 meses de edad. Los datos serológicos son valiosos para el diagnóstico ya que la detección del anticuerpo con la técnica IFA es sensible y específica, sin reacciones cruzadas con otros herpesvirus humanos (3,5,10,11-13).

Principio del ensayo

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

Materiales suministrados y condiciones de almacenamiento

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

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

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

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

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

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

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

Precauciones generales

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

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

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

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

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

Xn-Sustancia nociva

Precauciones de seguridad del control y del conjugado:

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

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.
Palabra Clave	ATENCIÓN	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.
Indicación de Peligro	H319 Provoca irritación ocular grave.	P337+P313 Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

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

- Separar asépticamente el suero recogido o el plasma y los hematies, y almacenar en congelación (-10 °C o menos) hasta el momento del ensayo. Evitar congelar y descongelar repetidas veces.
- Si así se desea, las muestras de suero líquido o plasma fresco se pueden almacenar a 2–8 °C hasta una semana, sin pérdida de actividad de los anticuerpos.
- No utilizar muestras excesivamente lipídicas sin antes deslipidarlas.
- No utilizar muestras contaminadas.
- Las muestras de suero duplicadas para demostrar seroconversión o un aumento significativo del título, deben recogerse con un intervalo de 7–14 días entre ellas, y luego deben analizarse simultáneamente.

Material adicional necesario

- Probetas, gradillas, pipetas, placas de microtitulación y dispositivos de seguridad para pipeteo, para realizar las diluciones de las muestras
- Incubador a 37 °C
- Cámara húmeda para la incubación de portaobjetos
- Gradilla para el soporte de portaobjetos y plato de tinción para el lavado de portaobjetos
- Cubreobjetos: 22 X 50 mm, vidrio de grosor nº 1
- Microscopio de fluorescencia: Se utilizó un microscopio de fluorescencia para calibrar los controles y el conjugado, equipado con lo siguiente:
 - Ocular de 10X
 - Objetivos de 16X o 40X
 - Epi-iluminador con lámpara halógena de 50 W
 - Filtro de excitación de FITC KP490
 - Filtro absorbente del amarillo K530
 - Filtro de supresión rojo BG38

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

Protocolo IFA

- Para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG, preparar una dilución de análisis de 1:20 de cada muestra en PBS. Preparar todas las diluciones con un volumen mínimo de 0,10 ml, con PBS como diluyente.
- Para la titulación cuantitativa de sueros, preparar diluciones de serie dobles de la muestra de suero en PBS, empezando con una dilución de 1:20, y añadiendo volúmenes iguales de suero diluido o plasma y PBS para cada dilución consecutiva.
- Retirar los portaobjetos de la bolsa protectora y colocar 1 gota (aproximadamente 20 µl) de la(s) muestra(s) de prueba diluida(s) en cada pocillo. Añadir volumen suficiente para cubrir completamente cada pocillo, pero evitar las mezclas cruzadas del contenido de los mismos. Nota: Las pruebas diarias requieren un pocillo para control positivo, uno para control negativo y uno para PBS (control de conjugado).
- Incubar los portaobjetos en la cámara húmeda durante 30 minutos a 37 °C.
- Enjuagar los portaobjetos en un pequeño chorro de tampón. Evitar el contacto directo con los pocillos.

6. Lavar los portaobjetos durante 10 minutos con un cambio de solución PBS al cabo de 5 minutos. Agitar los portaobjetos moviendo la gradilla hacia arriba y hacia abajo en el tampon.
7. Absorber la máscara de pintura que rodea los pocillos utilizando los absorbentes especiales.
8. Aplicar a cada pocillo una gota de conjugado listo para su uso.
9. Repetir los pasos 4 (incubación), 5 (clarificado con PBS), 6 (lavado de 10 minutos con PBS) y 7 (absorción).
10. Aplicar el medio de montaje de glicerol y un cubreobjetos de vidrio de 22 X 50 mm.
11. Observar la reactividad bajo microscopía de fluorescencia con una ampliación de 20-40X. Para obtener óptimos resultados, examinar los portaobjetos inmediatamente después de terminar el ensayo. Para obtener resultados equivalentes, sellar los portaobjetos o mantenerlos húmedos para minimizar la deshidratación del medio de montaje, almacenarlos en la oscuridad a 2-8 °C, y leerlos a los tres días. La intensidad de fluorescencia de la reactividad positiva puede oscilar de brillante a débil. Evaluar la reacción de fluorescencia según la siguiente escala de intensidad: 4° (muy brillante), 3° (brillante), 2° (moderada), 1° (débil).

Interpretación de los resultados

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

Significación de la interpretación

1. No se ha encontrado fluorescencia discernible de las células infectadas en la dilución de análisis.	1. La muestra es negativa en anticuerpos IgG frente al HHV6.
2. Se ha encontrado fluorescencia positiva específica de las células infectadas en la dilución de análisis o en diluciones más altas.	2. La muestra es positiva en anticuerpos IgG frente al HHV6, lo que indica una infección HHV6 anterior. La seroconversión o un aumento 4 veces mayor o más en el título de anticuerpos IgG en muestras de suero duplicadas, indica una infección reciente por HHV6.
3. Se ha encontrado fluorescencia tanto en las células infectadas como en las no infectadas.	3. La muestra analizada indica una reacción no específica.

Nota: La realización de un ensayo específico de anticuerpos IgM frente al HHV6, ayuda en el diagnóstico de una infección actual por HHV6.

Control de calidad

1. Para asegurarse de que el ensayo funciona correctamente, utilizar los controles positivo y negativo al menos una vez en las pruebas de cada día.
2. El tipo y antigüedad del microscopio de fluorescencia y las horas de uso de la bombilla UV, pueden afectar hasta cierto punto a la intensidad de la fluorescencia y a los puntos finales de la titulación. El control positivo de anticuerpos frente al HHV6 suministrado con este kit que indica una reacción de intensidad de 3° a 4°. El vial tiene un título listado que puede utilizarse como comprobación adicional del sistema de ensayo (ver Notificación de dilución 1°). Utilizarlo como calibrador de una reacción de intensidad de 3° a 4° en el microscopio.
3. Utilizar el control negativo de anticuerpos frente al HHV6 suministrado con este kit como calibrador de una reacción negativa en el equipo.
4. El ensayo de cada día deberá incluir un pocillo de PBS en lugar de una muestra. Este control de conjugado se utiliza para asegurarse de que el conjugado no reacciona con el sustrato celular.

Notificación de dilución 1*

El control positivo suministrado con este kit está envasado en vial listo para usar y proporciona que proporciona una intensidad de fluorescencia de 3° a 4° al ser analizado. Para obtener una intensidad de fluorescencia 1° deben realizarse diluciones dobles al título indicado en el vial que se incluye en este kit. Titular el control positivo con el uso inicial de este kit.

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

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 trayectoria óptica del microscopio y los filtros ópticos utilizados
5. la precisión de las técnicas de dilución y el equipo de dilución

Limitaciones del protocolo

1. Un ensayo serológico como el IFA sirve como ayuda en la detección de infección viral, pero no debe utilizarse como criterio único para el diagnóstico. Los resultados del ensayo se deben combinar con la información proporcionada por el paciente, la evaluación clínica y otros procedimientos de diagnóstico disponibles.
2. Un solo resultado positivo de anticuerpos IgG frente al HHV6 será significativo sólo en el caso de que indique una infección o un contacto previo con el virus. A efectos epidemiológicos, un solo resultado ya es útil. Sin embargo, no debe utilizarse como indicación de una infección actual o reciente por el virus.
- Para determinar una infección actual o reciente, deberá realizarse un ensayo simultáneo de muestras de plasma o suero duplicadas, recogidas con un intervalo de 7-14 días entre ellas. Un aumento 4 veces mayor o más en el título entre la primera y la segunda muestra es indicativo de una infección actual o reciente.
3. Las reacciones positivas no específicas, tales como las de anticuerpos antinucleares y/o anticuerpos anticitoplasmáticos, pueden producirse en muestras de pacientes con ciertas enfermedades autoinmunes. Tanto las células infectadas como las no infectadas mostrarán fluorescencia, lo cual puede oscurecer una reacción positiva

frente al HHV6. Por tanto, la observación de una reacción autoinmune no puede eliminar la posibilidad de una infección por HHV6.

Resultados esperados

Un alto porcentaje de individuos mayores de un año son seropositivos en anticuerpos anti-HHV6 (4-6). Estudios que utilizan el método IFA indican la prevalencia de índices de 80-95 % en niños mayores y adultos en la población general. No se comunicaron diferencias significativas en los índices de prevalencia debido a la localización geográfica.

Características de funcionamiento

Sensibilidad relativa y especificidad: Se evaluó el kit IFA HHV6 de SCIMEDX frente a un método IFA HHV6 disponible en el mercado. Las muestras estaban formadas de suero congelado retrospectivo. Cincuenta y siete sueros provenían de donantes con infección HHV6 conocida. Veintitrés sueros procedían de personas normales de varias edades, géneros y zonas geográficas. La concordancia general fue de 76/80 o del 95,0 %. Consultar la siguiente tabla.

HHV6 IFA de SCIMEDX

IFA alternativo	Estado HHV6	Positivo	Negativo	Total
	Positivo	57	1	58
	Negativo	3	19	22
	Total	60	20	80

Hay que tener en cuenta que 'relativa' se refiere 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 ausencia o la presencia de enfermedad. No se puede juzgar la exactitud de la comparación de los ensayos para predecir la enfermedad.

Reproducibilidad: Diez sueros positivos con varios títulos (1:20 -1:640) y cinco sueros negativos se diluyeron en serie por duplicado y se analizaron tres veces, determinándose el punto de referencia. Cuarenta y cuatro títulos de punto de referencia estuvieron dentro de las especificaciones de ± una dilución doble. Consultar la siguiente tabla.

Título idéntico	39/45
± una dilución doble	5/45
± dos diluciones dobles	1/45

Especificidad: Se analizaron 34 sueros positivos para actividad de anticuerpos frente a enfermedades con una reacción cruzada potencial frente al HHV6 con este kit IFA. Debido a la prevalencia de pacientes a nivel mundial con HHV6, se observó reactividad cruzada. Los datos se resumen en la siguiente tabla.

Datos de reactividad cruzada – IgG anti-HHV6 de SCIMEDX

Tipo de enfermedad	Total de muestras	Resultado positivo
Citomegalovirus	18	11/18
Virus de Epstein-Barr	32	24/32
Virus del herpes simple 1	26	17/26
Virus del herpes simple 7	22	18/22
Virus de la varicela-zoster	10	5/10
Total	34	24/34

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

Estabilidad en tiempo real

Lote de porta-objetos	Control	Título de punto de referencia al lanzamiento	Título de punto de referencia a los 24 meses
#1	Positivo	1:1280	1:1280
	Negativo	-	-
#2	Positivo	1:640	1:320
	Negativo	-	-
#3	Positivo	1:640	1:640
	Negativo	-	-

Referencias

1. Salahuddin, A.K., D.V. Ablashi, P.D. Markham, S.F. Josephs, S. Sturzenegger, M. Kaplan, G. Halligan, P. Bibерfeld, F. Wong-Staal, B. Kramarsky, and R.C. Gallo. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 234:596-601.
2. Josephs, S.F., S.Z. Salahuddin, D.V. Ablashi, F. Schacter, F. Wong-Staal, and R. C. Gallo. 1986. Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science*. 234:601-603.
3. Ablashi, D.V., S.F. Josephs, A. Buchbinder, K. Hellman, S. Nakamura, T. Liana, P. Lusso, M. Kaplan, J. Dahlberg, S. Memon, F. Imami, K.L. Ablashi, P.D. Markham, B. Kramarsky, G.R.F. Krueger, P. Bibерfeld, F. Wong-Staal, S.Z. Salahuddin, and R.C. Gallo. 1988. Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus 6). *J. Virol. Methods*. 21:29-48.
4. Stewart, J.A. 1990. Human herpesvirus 6: basic biology and clinical associations. In L.M. de la Maja and E. M. Peterson (ed.), *Medical virology*, Vol. 9. Plenum Press, New York.
5. Linde, A., H. Dahl, B. Wahren, E. Fridell, Z. Salahuddin, and P. Bibерfeld. 1988. IgG antibodies to human herpesvirus 6 in children and adults both in primary Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections. *J. Virol. Methods*. 21:117-123.
6. Briggs, M., J. Fox, and R.S. Tedder. 1988. Age prevalence of antibody to human herpesvirus 6. *Lancet*. i:396.
7. Yamanishi, K., T. Okuno, K. Shiraki, M. Tarahashi, T. Kando, Y. Asano, and T. Kurata. 1988. Identification of human herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. i:1065-1067.
8. Takahashi, K., S. Smuda, K. Kawakami, K. Migita, T. Oki, and T. Nagata. 1988. Human herpesvirus 6 and exanthem subitum. *Lancet*. i:1463.
9. Ueda, K., K. Kusuvara, M. Hirase, K. Okada, C. Migajaki, K. Tokugawa, M. Nakagama, and K. Yamanishi. 1989. Exanthem subitum and antibody to human herpesvirus 6. *J. Infect. Dis.* 159:750-752.
10. Irving, W.L., and A.L. Cunningham. 1990. Serological diagnosis of infection with human herpesvirus type 6. *Br. Med. J.* 300:158-159.
11. Linnavuori, K., H. Peltola, and T. Hovi. 1992. Serology versus clinical signs or symptoms and main laboratory findings in the diagnosis of exanthem subitum (roseola infantum). *Pediatrics*. 89:103-106.
12. Pruscananonda, P., C.B. Hall, R.A. Insul, K. McIntyre, P.E. Pellett, C.E. Long, K.C. Schnabel, P.H. Pincus, F.R. Stamey, T.R. Dambaugh, and J.A. Stewart. 1992. Primary human herpesvirus 6 infections in young children. *N. Engl. J. Med.* 326:1445-1450.

13. Hall, C.B., C.E. Long, K.C. Schnabel, M.T. Caserta, K.M. McIntyre, M.A. Costanzo, A. Knott, S. Dewhurst, R.A. Insul, and L.G. Epstein. 1994. Human herpesvirus 6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. N. Engl. J. Med. 331:432-438.

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



ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA INDIRECTA PARA O ANTICORPO IgG DO HERPESVÍRUS 6 (HHV6)

Somente para exportação

Somente para utilização em diagnóstico *in vitro*.

I-HV601G	120 Tests
I-HV602G	40 Tests
I-HV603G	40 Tests

Utilização

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

Introdução e resumo dos procedimentos do teste

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

O HHV6 é geneticamente e serologicamente distinto de outros herpesvírus humanos conhecidos (2-4). Estudos serológicos, utilizando o ensaio de fluorescência indirecta (IFA), demonstraram que o anticorpo do vírus se encontra frequentemente na população geral. A infecção primária ocorre, normalmente, antes dos dois anos de idade. Uma elevada percentagem de seres humanos com mais de um ano de idade são seropositivos para o anticorpo anti-HHV6 (4-6). A infecção primária em adultos é rara, devido à elevada percentagem de infecção durante a infância. Embora uma infecção primária em adultos saudáveis resulte, normalmente, em doença leiga, podem surgir complicações mais graves em doentes imunocomprometidos ou doentes submetidos a transplante de órgãos ou medula óssea (4).

O HHV6 foi identificado como o agente responsável da *roseola infantum*, também conhecida por *exantema súbito*. O vírus foi isolado em crianças com *exantema súbito* e a associação reforçada por estudos serológicos (7-9).

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

Princípio do teste

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

Materiais fornecidos e condições de armazenamento

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

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

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

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

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

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

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

Precauções gerais

I-HV601G Printed in U.S.A Rev C 5/4/18

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

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

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

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

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

Xn – Substância perigosa

Medidas de precaução e segurança do controlo e conjugado:

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

Componente	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Recomendação de prudência
Pictograma		Prevenção: P264 Lavar ... cuidadosamente após manuseamento. 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 de amostras, armazenamento e limitações das amostras para teste

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

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

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

Não utilizar amostras contaminadas.

Deverão ser colhidas amostras de soro emparelhadas, com uma diferença de 7 a 14 dias, armazenadas e, depois, simultaneamente testadas, para demonstrar a seroconversão ou aumento significativo do título.

Materiais adicionais necessários

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

Incubador a 37 °C.

Uma câmara de humidade para a incubação de lâminas.

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

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

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

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

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

Procedimento IFA

1. Para a determinação qualitativa de anticorpos IgG, preparar uma diluição de rastreio na proporção de 1:20 de cada amostra de teste em PBS. Preparar todas as diluições num volume mínimo de 0,10 ml com o PBS como diluente.
2. Para a titulação quantitativa de soros, preparar diluições duplas em série da amostra de soro em PBS, começando por uma diluição na proporção de 1:20 e acrescentando volumes iguais de soro ou plasma diluído e PBS para cada diluição sucessiva.
3. Remover as lâminas da bolsa de protecção e aplicar 1 gota (cerca de 20 µl) de amostra(s) diluída(s) em cada poço. Acrescentar volume suficiente para cobrir completamente cada poço, embora não deva ocorrer a mistura cruzada de conteúdos entre os poços. Nota: cada série de testes do dia requer um poço para o controlo positivo, um para o controlo negativo e um para o PBS (controlo de conjugado).
4. Incubar as lâminas numa câmara de humidade durante 30 minutos a 37 °C.
5. Lavar as lâminas num fluxo ligeiro de tampão. Evitar dirigir o fluxo para os poços.
6. Lavar as lâminas durante 10 minutos, mudando a solução PBS após 5 minutos. Agitar as lâminas, deslocando o suporte para cima e para baixo no tampão.

7. Absorver a máscara de tinta que circunda os poços de teste com os mata-borrões especiais.
8. Aplicar uma gota do conjugado pronto a utilizar em cada poço de teste.
9. Repetir os passos 4 (incubação), 5 (lavagem com PBS), 6 (lavagem com PBS durante 10 minutos) e 7 (absorção).
10. Aplicar o meio de montagem com glicerol e a lamela de vidro com 22 X 50 mm.
11. Observar a reactividade sob microscopia de fluorescência utilizando uma ampliação de 20-40X. Para melhores resultados, examinar as lâminas imediatamente após a conclusão do teste. Para obter resultados equivalentes, vedar as lâminas ou mantê-las húmidas para minimizar a secagem do meio de montagem, armazenar no escuro a 2-8 °C e interpretar no prazo de três dias. A reactividade positiva poderá variar em intensidade de fluorescência entre brillante a fraca. Classificar a reacção de fluorescência de acordo com a seguinte escala de intensidade: 4° (brilhante), 3° (viva), 2° (moderada), 1° (fraca).

Interpretação dos resultados

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

A ausência de coloração específica por fluorescência das células infectadas revela uma reacção negativa dos anticorpos IgG do HHV6.

Significado da interpretação

4. Ausência de fluorescência diferenciável das células infectadas detectadas na diluição de rastreio.	4. A amostra de teste é negativa para o anticorpo do IgG do HHV6.
5. Detectada fluorescência positiva específica das células infectadas na diluição de rastreio ou em diluições mais elevadas.	5. A amostra de teste é positiva para o anticorpo IgG do HHV6, indicando infecção anterior por HHV6. A seroconversão ou um aumento do título dos anticorpos IgG em quatro vezes ou superior entre as amostras de soro emparelhadas indica uma infecção recente por HHV6.
6. Fluorescência detectada nas células infectadas e não infectadas.	6. A amostra de teste apresenta uma reacção não específica.

Nota: a realização de um teste específico ao anticorpo IgM do HHV6 contribui para o diagnóstico de uma infecção actual por HHV6.

Controlo de qualidade

1. Para assegurar a funcionalidade adequada do teste, utilizar os controlos positivo e negativo pelo menos uma vez para cada dia de testes.
2. O tipo e a caducidade do microscópio de fluorescência e as horas de utilização da lâmpada de UV podem afectar a intensidade da fluorescência e as titulações finais até certo ponto. O controlo positivo para o anticorpo do HHV6 é fornecido com este kit em frascos, que apresenta uma reacção de intensidade entre 3° e 4°. O frasco inclui um título indicado que deve ser utilizado como verificação adicional no sistema de teste (consultar nota relativa à diluição 1°). Utilizar isto como calibrador para uma reacção de intensidade 3° a 4° no microscópio.
3. Utilizar o controlo negativo para o anticorpo do HHV6, fornecido com este kit, como calibrador para uma reacção negativa no equipamento.
4. O teste do dia deverá incluir um pouco de PBS em substituição da amostra de teste. Trata-se de um controlo de conjugado para assegurar a não reacção do conjugado com o substrato de células.

Nota relativa à diluição 1°

O controlo positivo deste kit é fornecido em frascos, pronto para uso e fornece para oferecer uma intensidade de fluorescência de 3° e 4° quando testado. Para obter uma intensidade de fluorescência de 1°, providenciar diluições duplas com o título indicado no frasco fornecido com este kit. Titular o controlo positivo com a utilização inicial do kit.

O título obtido nos testes poderá diferir da diluição indicada, devido a várias razões técnicas. É conveniente testar o título indicado no frasco, assim como as diluições duplas imediatamente antes de avançar e seguindo o título indicado. É normal que os resultados obtidos para um título final (1°) difiram entre laboratórios, devido a factores que afectam a intensidade da fluorescência. Estes factores incluem:

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

Limitações do procedimento

1. Um teste serológico, tal como o IFA, contribui para a detecção da infecção vírica, mas a sua utilização não deverá ser o único critério. Os resultados do teste devem ser utilizados conjuntamente com as informações disponibilizadas pelo doente, a avaliação clínica e outros procedimentos de diagnóstico disponíveis.
2. Um único resultado positivo para o anticorpo IgG do HHV6 é importante apenas porque indica contacto ou infecção anterior pelo vírus. Para fins epidemiológicos, um único resultado é útil. Não deve, contudo, ser utilizado como indicação de infecção actual ou recente pelo vírus.
3. Para determinar uma infecção actual ou recente, deverão ser realizados testes simultâneos a amostras de soro ou plasma emparelhadas, colhidas com uma diferença de 7 a 14 dias. Um aumento quatro vezes ou superior do título entre a primeira e a segunda amostra é indicativo de uma infecção actual ou recente.
4. Podem ocorrer reacções positivas não específicas, tais como reacções de anticorpos antinucleares e/ou anticorpos anticoplasmáticos, em amostras de doentes com determinadas doenças autoimunes. As células infectadas e não infectadas ficarão fluorescentes, o que poderá obscurecer uma reacção HHV6 positiva. Por isso, a observação de uma reacção autoimune não pode excluir a possibilidade de infecção por HHV6.

Valores esperados

Uma elevada percentagem de seres humanos com mais de um ano de idade são seropositivos para o anticorpo anti-HHV6 (4-6). Estudos realizados com a utilização do método IFA indicam taxas de prevalência entre 80 a 95 % em crianças mais velhas e adultos, na população geral. Não foram relatadas diferenças significativas nas taxas de prevalência relacionadas com a localização geográfica.

Características de desempenho

Sensibilidade e especificidade relativas: o kit IFA do HHV6 da SCIMEDX foi avaliado em comparação com um IFA de HHV6 disponível no mercado. As amostras utilizadas foram soros retrospectivos congelados. Cinquenta e sete soros eram provenientes de doadores com infecção conhecida por HHV6. Vinte e três soros eram provenientes de pessoas normais de diversas idades, de ambos os性es e de diferentes áreas geográficas. A concordância geral foi de 76/80 ou 95,0 %. Consultar a tabela que se segue.

IFA de HHV6 da SCIMEDX				
IFA Alternativo	Estado do HHV6	Positivo	Negativo	Total
	Positivo	57	1	58
	Negativo	3	19	22
	Total	60	20	80

Ter em atenção que "relativo" refere-se à comparação dos resultados deste ensaio aos de um ensaio idêntico. Não houve uma tentativa de correlacionar os resultados do ensaio com a presença ou ausência de doença. Não é possível fazer qualquer avaliação sobre a precisão do ensaio de comparação na previsão da doença.

Reprodutibilidade: dez amostras de soro positivas com vários títulos (1:20-1:640) e cinco de soro negativas foram diluídas em série e analisadas três vezes cada, sendo o título final determinado. Quarenta e quatro dos títulos finais encontravam-se dentro das especificações de \pm uma diluição dupla. Consultar a tabela que se segue.

Título idêntico	39/45
\pm uma diluição dupla	5/45
\pm duas diluições duplas	1/45

Especificidade: foram testadas trinta e quatro amostras de soro positivas para o anticorpo de doenças com potencial para reactividade cruzada ao HHV6 neste kit IFA. Devido à prevalência do HHV6 em doentes a nível mundial, foi observada reactividade cruzada. A tabela abaixo resume os resultados.

Dados de Reactividade Cruzada - SCIMEDX-IgG HHV6

Tipo de Doença	Total de Amostras	Resultado Positivo
Citomegalovírus	18	11/18
Vírus Epstein-Barr	32	24/32
Vírus Herpes Simplex tipo 1	26	17/26
Vírus Herpes Simplex tipo 7	22	18/22
Vírus Varicela-zoster	10	5/10
Total	34	24/34

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

Estabilidade em tempo real			
Lote de lâminas	Controlo	Título final na libertação	Título final em 24 meses
n.º 1	Positivo	1:1280	1:1280
	Negativo	-	-
n.º 2	Positivo	1:640	1:320
	Negativo	-	-
n.º 3	Positivo	1:640	1:640
	Negativo	-	-

Literatura consultada

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

 SCIMEDX CORPORATION
53 Richboyton 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



	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 Gebrauchsanweisung 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

IVD	For in vitro diagnostic use Per uso diagnostico <i>in vitro</i> Para uso solo in vitro Usage <i>in vitro</i> 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 Solution de montage, glycérol 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 contratinación
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 di contrasto Contraste Contrecolorant Gegenfärbung
CS	Coverslip Coprioggetto Cubre portaobjetos Lamelles couvre-objet Deckgläshen
BLT	Blotters Buvards Löschkopierpapier Tamponi di carta assorbente Absorbentes
DIL	Sample Diluent Diluente del campione Diluyente de muestra Tampon de dilution Probenverdünnungslösung