

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

EXPORT ONLY

I-HV801G 120 Tests
I-HV803G 40 Tests

Intended Use

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

Introduction and Summary of Test Procedures

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

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

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

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

Principle of the Test

SCIMEDX fluorescent antibody assays use the indirect method of antibody detection and titer determination. Patient serum or plasma samples are applied to cultured cells containing inactivated viral antigens provided on paint delineated wells on glass microscope slides. During a 30 minute incubation, antibody specific for HHV8 antigens forms an antigen/antibody complex with the HHV8 antigens in the infected cells. In a brief washing step, nonspecific antibody and other unreacted serum proteins are eliminated. Fluorescein-conjugated goat anti-human IgG is then applied to the wells of the glass slide. The anti-IgG conjugate combines with human IgG, if present, during a 30 minute incubation. After a brief wash to remove unreacted conjugate, the slides are viewed by fluorescence microscopy. A positive antibody reaction is denoted by bright green fluorescence at the antigen sites.

Materials Furnished and Storage Conditions

HHV8-Latent Antigen Slides: Slides of human lymphocytes expressing HHV8 latent antigens on each glass well. The slides are ready for use after removal from protective pouch. Store at 2-8°C. Slides are stable at this storage condition until the expiration date stated on the pouch label.

HHV8 IgG Positive Control: Each vial contains 0.5 ml HHV8 IgG antibody positive human control. This component is a ready for use liquid. Store at 2-8°C. Liquid positive control is stable at this storage condition until the expiration date stated on the vial label.

HHV8 IgG Negative Control: Each vial contains 0.5 ml HHV8 IgG antibody negative human control. This component is a ready for use liquid. Store at 2-8°C. Liquid negative control is stable at this storage condition until the expiration date stated on the vial label.

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

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

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

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

General Precautions

IFA Test Kit: No US Standard of Potency.

- Store all kit components at their recommended or suggested temperatures. **Do not freeze.**
- Do not use the components beyond the stated expiration date of each component.
- SCIMEDX optimizes all of the active components in each lot of its IFA kits as a unit. Do not mix components from different lots or from different sources.

- The controls and conjugate contain 0.095% sodium azide that, if allowed to accumulate, can form explosive compounds in lead and/or copper plumbing. Flush drains thoroughly if used to dispose of these materials.
- Use separate pipette tips for each sample and reagent to avoid cross contamination.
- Reagents should be inspected for evidence of bacterial or fungal contamination.

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

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

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

Xn-Harmful Substance

Control and Conjugate Safety Precaution:

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

US

Component	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Precautionary Statement Prevention:
Pictogram		Response: <ul style="list-style-type: none"> • Wash thoroughly after handling. • Wear eye/face protection
Signal Word	WARNING	Storage/Disposal: <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		Response: <ul style="list-style-type: none"> P264 Wash thoroughly after handling. P280 Wear protective gloves and clothing.
Signal Word	WARNING	Storage/Disposal: <ul style="list-style-type: none"> P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses if easy to do. Continue rinsing. P337+P313 If irritation persists, get medical advice/attention.
Hazard Statement	H319 Causes serious eye irritation.	

Specimen Collection, Storage and Limitations of Test Samples

- Separate aseptically collected serum or plasma from the red blood cells and store frozen (-10°C or lower) until ready for testing. Avoid repeated freezing and thawing.
- If desired, store fresh liquid serum or plasma samples at 2° to 8°C for up to one week without loss of antibody activity.
- Do not use excessively lipemic samples without delipidization.
- Do not use contaminated samples.
- Paired serum samples to demonstrate seroconversion or significant titer increase should be collected 7-14 days apart, stored, then tested simultaneously.

Additional Materials Required

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

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

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

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

IFA Procedure

1. For qualitative IgG antibody determination, prepare a 1:64 screening dilution of each test sample in PBS. Prepare all dilutions in a minimum volume of 0.10 ml with PBS as the diluent.
2. For quantitative titration of sera, prepare two-fold serial dilutions of the serum sample in PBS, starting with a 1:64 dilution, and adding equal volumes of diluted serum or plasma and PBS for each consecutive dilution.
3. Remove slides from protective pouch and apply 1 drop (approximately 20 µl) of the diluted test sample(s) to each well. Add sufficient volume to completely cover each well, but cross-mixing of contents between wells should not occur. Note: Each day's test run requires one well each for positive control, negative control, and PBS (conjugate control).
4. Incubate the slides in a moist chamber for 30 minutes at 37°C.
5. Rinse the slides in a light stream of buffer. Avoid directing the stream at the wells.
6. Wash the slides for 10 minutes with a change of PBS solution after 5 minutes. Agitate the slides by moving the rack up and down in the buffer.
7. Blot the paint mask surrounding the test wells with the special blotters.
8. Apply one drop of the ready to use conjugate to each test well.
9. Repeat steps 4 (incubation), 5 (PBS rinse), 6 (10 minute PBS wash), and 7 (blot).
10. Apply the glycerol mounting media and 22 X 50 mm glass coverslip.
11. Observe the reactivity under fluorescence microscopy using 20-40X magnification. For best results, examine slides immediately after completion of the test. To obtain equivalent results, seal slides or keep humidified to minimize dehydration of mounting medium, store in dark at 2-8°C, and read within three days. Positive reactivity may range in fluorescence intensity from brilliant to weak. Grade the

fluorescence reaction according to the following intensity scale: 4⁺ (brilliant), 3⁺ (bright), 2⁺ (moderate) and 1⁺ (weak).

Interpretation of Results

- Bright green fluorescent staining of the infected cells denotes a HHV8 IgG antibody positive reaction. The fluorescent staining pattern for antibody to latent HHV8 antigens is particulate fluorescence in the nucleus of the cells. To provide an internal control, each well on the microscope slide contains both HHV8 infected and uninfected cells. Preparation of the slide in this manner is intentional. Uninfected cells, stained red by the counterstain, provide a contrasting background. Infectivity of the cells ranges from 50-80%. Titration of positive HHV8 IgG sera will provide quantitative information. In a titration series, the highest serum dilution demonstrating a 1⁺ reaction is interpreted as the endpoint.
- Absence of specific fluorescent staining of the infected cells denotes a negative reaction for HHV8-Latent IgG antibody.

Significance of Interpretation

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

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

Quality Control

- To ensure the test is working properly, use the positive and negative controls at least once for each day's testing.
- The type and age of the fluorescence microscope and hours of UV bulb usage can affect fluorescence intensity and titration endpoints to some degree. The HHV8 antibody positive control furnished with this kit demonstrates a 2⁺ to 4⁺ intensity reaction. The vial has a listed titer to use as an additional check for the test system (see 1⁺ Dilution Notice). Use this as the calibrator for a 2⁺ to 4⁺ intensity reaction on your microscope.
- Use the HHV8 antibody negative control furnished with this kit as the calibrator for a negative reaction on your equipment.
- Each day's test should include one PBS well in place of a test sample. This is a conjugate control to ensure the conjugate is not reacting with the cell substrate.

1⁺ Dilution Notice

The positive control in this kit is ready to use and provides a 2⁺ to 4⁺ fluorescent intensity when tested. To obtain a 1⁺ fluorescent intensity, make two-fold dilutions to the titer indicated on the vial included in this kit. Titer the positive control with the initial use of the kit.

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

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

Limitations of the Procedure

- A serological test such as the IFA serves as an aid to detect viral infection, but its use should not be the sole criteria. The test results should be used in conjunction with information available from the patient, clinical evaluation and other available diagnostic procedures.
- A single positive result for HHV8 IgG antibody is significant only in that it indicates previous contact or infection with the virus. For epidemiological purposes a single result is useful. It should not be used, however, as an indication of current or recent infection with the virus.
- To determine current or recent infection, simultaneous testing of paired specimens of plasma or serum taken 7-14 days apart should be done. A four-fold or greater rise in titer between the first and second sample is indicative of a current or recent infection.
- Nonspecific positive reactions such as antinuclear antibody and/or anticytoplasmic antibody reactions can occur in samples from patients with certain autoimmune diseases. Both infected and uninfected cells will fluoresce, and this may obscure a positive HHV8 reaction. Therefore, observation of an autoimmune reaction cannot eliminate the possibility of HHV8 infection. In the test for latent antibody, the possibility of a positive ANA reaction being read as positive for latent antibody does exist. Comparison with the positive control, with its particulate reaction, or the testing of the sample with a test specific for ANA could be helpful to eliminate false positives.

Expected Values

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

Performance Characteristics

Relative Sensitivity and Specificity

This kit was compared with an ELISA kit commercially available for *in vitro* diagnostic use to determine the sensitivity and specificity between the two tests. The study tested 311 human serum samples that consisted of samples from patients with Kaposi's sarcoma, Human Herpes Virus 6 and multiple myelomas. Sera from normal blood donors were also included. The data is summarized in the following table.

SCIMEDX IFA

Samples	HHV8-Latent Status	Reactive	Non-reactive	Total
Kaposi's Sarcoma	Reactive	86	16	102
	Non-reactive	0	0	
Blood	Reactive	0	1	

Alternate ELISA	Donors	Non-reactive	2	191	194
Multiple Myelomas	Reactive	0	0	10	
	Non-reactive	0	10		
HHV6 Positive	Reactive	0	0	5	
	Non-reactive	0	5		
Total		88	223	311	

Serological Agreement: =292/311 = 93.9%

Reproducibility

Four seropositive samples with various titers (1:128 to 1:4096) and three seronegative samples were serially two-fold diluted and assayed four times each on two different days and the endpoint determined. Twenty-seven of the twenty-eight endpoint titers were within specification of plus or minus one two-fold dilution.

Identical titer	23/28
± one, two-fold dilution	4/28
± two, two-fold dilutions	1/28

HHV8 Specificity

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

Cross Reactivity Data-SCIMEDX HHV8 IgG

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

Real Time Stability

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

Real Time Stability

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

Literature Cited

- Chang, Y., E. Ceserman, M.S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D.M. Knowles, and P.S. Moore. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **265**: 1865-1869.
- Levy, J.A. 1997. Three new human herpesviruses (HHV6, 7 and 8). *Lancet* **349**: 558-562.
- Beral, V. 1996. Epidemiology of Kaposi's sarcoma, in *Cancer Surveys*, vol. 10: Cancer, HIV, and AIDS (Beral, V., Jaffe, H.W., Weiss, R., eds) pp5-22. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Ganem, D. 1996. Human herpesvirus 8 and the biology of Kaposi's sarcoma. *Virology* **7**: 325-332.
- Luppi, M., and G. Torrelli. 1996. The new lymphotropic herpesviruses (HHV-6, HHV-7, HHV8) and Hepatitis C Virus (HCV) in human lymphoproliferative diseases: an overview. *Haematologica* **81**: 265-281.
- Kim, S., S.H. Kang, J. Moon, M.S. Kim, Y.S. Kim, K. Park. 1998. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* **30**: 3165.
- Miller, G., M. Rigby, L. Heston, E. Grogan, R. Sun, C. Metroka, J. Levy, S-J. Gao, Y. Chang, P. Moore. 1995. Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *New Engl J Med* **334**:1291-1297.
- Lennette, E.T., D.J. Blackburn, and J.A. Levy. 1996. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* **348**: 858866.
- Blackburn, D.J., J. Ambroziak, E. Lennette, M. Adams, B. Ramachandran, and J.A. Levy. 1997. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor. *Lancet* **349**: 609-611.
- Simpson, G.R., T.F. Schultz, D. Whitley, P.M. Cook, C. Boshoff, L. Rainbow, M.R. Howard, S.Gao, R.A. Bohenzky, P. Simmonds, C. Lee, A. de Ruiter, A. Hatzakis, R.S. Tedder, I.V.D. Weller, R.A. Weiss, and P.S. Moore. 1996. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* **349**: 1133-1138.
- Kedes, D.H., D. Ganem, N. Ameli, P. Bacchetti, and R. Greenblatt. 1997. The prevalence of serum antibody to human herpesvirus 8 (Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus) among HIV-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. *JAMA* **277**: 478-481.
- Kedes, D.H., E. Operksalski, M. Busch, K. Kohn, J. Flood, D. Ganem. 1996. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Med.* **2**: 918-921.
- Martin, J.N., D.Ee. Ganem, D.H. Osmond, K.A. Page-Shafer, D. Macrae, and D.H. Kedes. 1998. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *New Engl. J Med.* **338**: 948-954.
- Chatlynne, L.G., W. Lapps, M. Handy, Y.Q. Huang, R. Masood, A.S. Hamilton, J.W. Said, H.P. Koeflffer, M.H. Kaplan, A. Friedman-Kien, P.S. Gill, J.E. Whitman, and D.V. Abashli. 1998. Detection and titration of human herpesvirus-8 specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* **92**: 53-58.

SCIMEDX CORPORATION

53 Hightwayton Rd
Denville, NJ 07831 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8796
www.scimedx.com



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



INDIREKTER FLUORESZENZ-ASSAY AUF IgG-ANTIKÖRPER GEGEN HUMANES HERPESVIRUS 8 (HHV8 LATENT)

Nur zum Export bestimmt

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

I-HV801G	120 Tests
I-HV803G	40 Tests

Verwendungsanzweck

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

Einführung und Übersicht über die Testverfahren

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

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

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

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

Testprinzip

Die Immunfluoreszenz-Antikörpertests von SCIMEDX Corp. verwenden die indirekte Methode zum Nachweis von Antikörpern und zur Titerbestimmung. Patientenserum- oder Plasmaproben werden in Zellkulturen mit inaktivierten Viren-Antigenen gegeben, die sich in farbmarkierten Kavitäten auf Glas-Objekträgern befinden. Während der Inkubationszeit von 30 Minuten bilden für HHV8-Antigene typische Antikörper einen Antigen-/Antikörperkomplex mit den HHV8-Antigenen in den infizierten Zellen. Unspezifische Antikörper und andere freie Serumproteine werden in einem kurzen Waschvorgang entfernt. Fluoreszein-konjugiertes Antihuman-IgG von der Ziege wird dann in die Kavitäten auf dem Glas-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

HHV8-latente Antigen-Objekträger: Objekträger mit menschlichen Lymphozyten, die HHV8-latente Antigene exprimieren, 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 Beutelkennetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

HHV8 IgG-positive Kontrolle: Jedes Fläschchen enthält 0,5 ml HHV8 IgG-Antikörper-positive Humankontrolle. Diese Komponente ist eine gebrauchsfertige Flüssigkeit. Bei 2–8 °C lagern. Bei diesen Lagerbedingungen ist die flüssige positive Kontrolle bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

HHV8 IgG-negative Kontrolle: Jedes Fläschchen enthält 0,5 ml HHV8 IgG-Antikörper-negative Humankontrolle. Diese Komponente ist eine gebrauchsfertige Flüssigkeit. Bei 2–8 °C lagern. Bei diesen Lagerbedingungen ist die flüssige negative Kontrolle bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Fluoreszein-Konjugat: Jedes Fläschchen enthält 1,5 ml Fluoreszein-konjugiertes (inaktiviertes) Antihuman-IgG von der Ziege (schwere und leichte Kette) mit Evans Blue- und Rhodamin-Gegenfärbung. Das Fluoreszein-Konjugat ist eine Konjugation aus mithilfe von Affinitätschromatographie gereinigtem Antihuman-IgG und Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC). Durch das Hinzufügen von Evans Blue- und Rhodamin-Gegenfärbung zum Konjugat wird die nicht spezifische Fluoreszenz der Gewebekulturzellen maskiert. Diese Komponente ist eine

gebrauchsfertige Flüssigkeit. Bei 2–8 °C lagern. Bei diesen Lagerbedingungen ist das flüssige Konjugat bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

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

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

Spezielles Löschespapier: Saugfähiges Löschespapier 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 Corp. 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 Kreuzkontamination 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 wiederverwendeten Objekträger.

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

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, Gummistiele, Pipetten, Mikrotiterplatten und Sicherheits-Pipettiervorrichtungen zur Herstellung der Probenverdünnungen.

* Inkubator, 37 °C

* Feuchte Kammer zur Inkubation der Objekträger

* Objekträgergestell und Färbeschale zum Waschen der Objekträger

* Deckgläser: 22 x 55 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-Sperfilter 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 1:64 für jede Probe in phosphorgepuffter Kochsalzlösung herstellen. Alle Verdünnungen in einem Mindestvolumen von 0,10 ml mit phosphorgepuffter Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel herstellen.

2. Für eine quantitative Titrierung der Seren eine zweifache Serenverdünnung der Serumprobe in PBS herstellen. Dabei mit einer Verdünnung von 1:64 beginnen und gleiche Mengen an verdünntem Serum oder Plasma und PBS für jede Verdünnung zugeben.

3. Die Objektträger aus dem Schutzbeutel nehmen und 1 Tropfen (ca. 20 µl) der verdünnten Proben in jede Kavität geben. Ausreichend Flüssigkeit zugeben, um alle Kavitäten zu füllen. Der Inhalt der Kavitäten darf sich jedoch nicht vermischen. Hinweis: Der tägliche Testlauf erfordert je eine Kavität für die positive Kontrolle, negative Kontrolle und PBS (Konjugatkontrolle).
4. Die Objektträger 30 Minuten lang bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
5. Die Objektträger in einem dünnen Strahl Pufferlösung spülen. Den Strahl nicht direkt auf die Kavitäten richten.
6. Die Objektträger 10 Minuten lang waschen. Dabei die PBS-Lösung nach 5 Minuten wechseln. Die Objektträger mit dem Gestell in der Pufferlösung auf und ab bewegen.
7. Die Farbmaske um die Kavitäten mit dem speziellen Löschpapier 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 20-40-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachten. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die Objektträger direkt nach Abschluss des Tests untersucht werden. Für gleichwertige Ergebnisse die Objektträger versiegeln oder feucht aufbewahren, um den Feuchtigkeitsverlust des Eindeckmittels zu minimieren. Im Dunkeln bei 2-8 °C aufbewahren und innerhalb von 3 Tagen die Ergebnisse ablesen. Eine positive Reaktivität kann durch eine intensive bis schwache Fluoreszenz gekennzeichnet sein. Die Fluoreszenzreaktion nach der folgenden Intensitätsskala bewerten: 4+ (intensiv), 3+ (leuchtend), 2+ (mäßig), 1+ (schwach).

Auswertung der Ergebnisse

- Eine leuchtend grüne fluoreszierende Färbung der infizierten Zellen weist auf eine HHV8 IgG-Antikörper-positive Reaktion hin. Das fluoreszierende Färbemuster für Antikörper gegen latente HHV8-Antigene besteht aus Fluoreszenzpartikeln in den Zellkernen. Zur internen Kontrolle enthält jede Kavität auf dem Objektträger sowohl mit HHV8 infizierte als auch nicht infizierte Zellen. Der Objektträger wird mit Absicht so präpariert. Die nicht infizierten Zellen werden von der Gegenfärbung rot gefärbt und dienen als kontrastreicher Hintergrund. Die Infektosität der Zellen liegt zwischen 50 und 80 %. Die Titrierung positiver HHV8 IgG-Seren liefert quantitative Informationen. In einer Titrierungsserie gilt die höchste Serumverdünnung, bei der eine Reaktion von 1+ eintritt, als Endpunkt.
- Die Abwesenheit einer spezifischen fluoreszierenden Färbung der infizierten Zellen weist auf eine negative Reaktion auf HHV8-latente IgG-Antikörper hin.

Bedeutung der Auswertung

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

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

Qualitätskontrolle

1. Zur Überprüfung der ordnungsgemäßen Funktion des Tests mindestens einmal täglich die positive und negative Kontrolle verwenden.
2. Art und Alter des Fluoreszenzmikroskops sowie die Betriebsstunden der UV-Lampe können die Fluoreszenzintensität und die Titrierungs-Endpunkte bis zu einem gewissen Grad beeinflussen. Die in diesem Kit enthaltene HHV8-Antikörper-positive Kontrolle wird in abgepackt, die eine Intensitätsreaktion von 2+ bis 4+ aufweist. Auf dem Fläschchen ist ein Titer angegeben, der als zusätzliche Prüfung für das Testsystem verwendet werden kann (siehe 1+ Verdünnungshinweis). Dieser ist als Kalibrator für die 2+ zu 4+ Intensitätsreaktion auf Ihrem Mikroskop zu verwenden.
3. Die im Kit enthaltene HHV8-Antikörper-negative Kontrolle als Kalibrator für eine negative Reaktion mit Ihrer Ausrüstung verwenden.
4. Der tägliche Testlauf sollte eine PBS-Kavität anstelle einer Probe enthalten. Dies ist eine Konjugatkontrolle, mit der gewährleistet wird, dass das Konjugat nicht mit dem Zellsubstrat reagiert.

1+ Verdünnungshinweis

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

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

Einschränkungen des Verfahrens

1. Ein serologischer Test wie z. B. ein IFA-Test dient als Hilfe beim Nachweis einer Virusinfektion, sollte jedoch nicht als einziges Kriterium verwendet werden. Die Testergebnisse sind in Verbindung mit vom Patienten zur Verfügung gestellten Informationen, einer klinischen Beurteilung sowie anderen verfügbaren Diagnoseverfahren zu verwenden.
2. Ein einzelnes positives Ergebnis für HHV8 IgG-Antikörper ist nur insofern signifikant als es auf einen früheren Kontakt bzw. eine Infektion mit dem Virus hinweist. Ein einzelnes Ergebnis ist hilfreich für epidemiologische Zwecke. Es sollte jedoch nicht als Hinweis auf eine frische oder kürzlich erfolgte Infektion mit dem Virus verwendet werden. Um eine frische oder kürzlich erfolgte Infektion zu bestimmen, wird ein gleichzeitiger Test von oder Plasma- oder Serumprobenpaaren empfohlen. Die Problem sollten im Abstand von 7 bis 14 Tagen entnommen werden. Ein mindestens vierfacher Titeranstieg zwischen der ersten und zweiten Probe weist auf eine frische oder kürzlich erfolgte Infektion hin.

3. Unspezifische positive Reaktionen wie z. B. antinukleäre und/oder antizytoplasmatische Antikörperreaktionen können in Proben von Patienten mit bestimmten Autoimmunerkrankungen auftreten. Sowohl infizierte als auch nicht infizierte Zellen fluoreszieren. Dies kann eine positive HHV8-Reaktion verdecken. Daher schließt das Auftreten einer Autoimmunreaktion nicht die Möglichkeit einer HHV8-Infektion aus. Beim Test auf latente Antikörper besteht die Möglichkeit, dass eine positive ANA-Reaktion versehentlich als positiv für latente Antikörper gelesen wird. Ein Vergleich mit der positiven Kontrolle, mit ihrer Partikelreaktion oder das Testen der Probe mit einem spezifischen Test für ANA kann bei der Eliminierung falscher positiver Ergebnisse helfen.

Referenzwerte

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

Leistungscharakteristika

Relative Sensitivität und Spezifität

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

SCIMEDX IFA					
	Proben	HHV8-latenter Status	Reaktiv	Nicht reaktiv	Gesamt
Alternativer ELISA-Test	Kaposi-Sarkom	Reaktiv	86	16	102
	Nicht reaktiv	0	0		
	Blutspender	Reaktiv	0	1	194
	Nicht reaktiv	2	191		
Plasmozytome	Reaktiv	0	0	10	
	Nicht reaktiv	0	10		
	HHV6-positiv	Reaktiv	0	0	5
		Gesamt	88	223	311

Serologische Übereinstimmung: = 292/311 = 93,9 %

Reproduzierbarkeit

Vier seropositive Proben mit unterschiedlichen Titern (1:128 bis 1:4096) sowie drei seronegative Proben wurden nacheinander zweifach verdünnt und viermal an zwei verschiedenen Tagen getestet. Der Endpunkt wurde bestimmt. Siebenundzwanzig der achtundzwanzig Endpunkt-Titer lagen innerhalb der Spezifikationen für ± eine zweifache Verdünnung.

Identischer Titer 23/28

± eine zweifache Verdünnung	4/28
± zwei zweifache Verdünnungen	1/28

HHV8-Spezifität

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

Daten zur Kreuzreakтивität: SCIMEDX HHV8 IgG-Test

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

Echzzeitstabilität

Die Echzzeitstabilität 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 liegen innerhalb der Spezifikationen. Siehe folgende Tabelle.

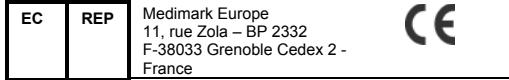
Echzzeitstabilität

Objekträr-ger- Charge	Kontrolle	Anfänglicher Endpunkt-Titer	Endpunkt-Titer nach 24 Monaten
Nr. 1	Positiv	1:512	1:256
	Negativ	—	—
Nr. 2	Positiv	1:512	1:512
	Negativ	—	—
Nr. 3	Positiv	1:512	1:256
	Negativ	—	—

Literaturnachweis

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

 SCIMEDIX CORPORATION
53 Richboynton Rd
Dover, NJ 07801 USA
Tel: 800.221.5588 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8796
www.scimedix.com





SAGGIO DI FLUORESCENZA INDIRETTA PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI IgG CONTRO L'HERPESVIRUS UMANO DI TIPO 8 (HHV8 LATENTE)

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

I-HV801G 120 Tests
I-HV803G 40 Tests

Uso previsto

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

Introduzione e riepilogo delle procedure d'analisi

L'herpesvirus umano 8 (HHV8), conosciuto anche come herpesvirus associato al sarcoma di Kaposi (KSHV), è stato identificato nel 1994 da Chang dalle lesioni del sarcoma di Kaposi (KS). È stato scoperto che le sequenze uniche di DNA che ricordano molto le regioni dell'herpesvirus saimiri e del virus di Epstein-Barr esistono in tutte le forme di sarcoma di Kaposi del mondo, indipendentemente dal fatto che il KS sia associato o meno all'infezione del virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Il KS classico è un tumore maligno raro che colpisce gli uomini anziani del Mediterraneo. Il KS è il neoplasma più frequente nei pazienti con sindrome di immunodeficienza acquisita (AIDS). È stato osservato anche in individui ricevitori di trapianti e in alcune popolazioni africane. Inoltre l'HHV8 è stato associato anche ai linfomi delle cavità corporee, chiamati anche linfomi da effusione primaria, alla malattia di Castleman multicentrica, al linfoma non Hodgkin e al mieloma multiplo (1-6).

L'HHV8 ora è classificato come un herpesvirus gamma, del genere Rhadinovirus e ricorda l'EBV per il tropismo per le cellule B e per la capacità di rimanere in forma latente. Sebbene le colture cellulari sviluppate dai linfomi delle cavità corporee spesso sono coinfettati con l'HHV8 e l'EBV, alcune di esse sono EBV-negative. Se le colture cellulari sono infettate con l'HHV8 in fase latente, possono essere indotte chimicamente a produrre virus in replicazione attiva. Quindi queste linee cellulari infettate con l'HHV8, ma EBV-negative, sono state utilizzate per gli studi sierologici al fine di rilevare gli anticorpi contro diverse proteine virali, inclusi gli antigeni latenti e in particolar modo gli antigeni nucleari associati alla latenza (LANA) e gli antigeni litiči espressi dal virus replicante (7-8).

Gli studi sierologici hanno mostrato che l'infezione da HHV8 precede lo sviluppo del tumore del KS clinico. Studi suggeriscono che l'HHV8 è sessualmente trasmesso e che l'infezione da HHV8 non è comune nella popolazione generale al contrario di altri herpesvir. Diversi test sierologici hanno dimostrato varie frequenze di prevalenza per gli anticorpi HHV8 nella popolazione normale adulta, da frequenze basse del 4 % a frequenze del 25 %. È necessario stabilire frequenze di prevalenza più accurate con l'uso di una combinazione di test che misurano gli anticorpi contro antigeni sia litiči che latenti e con la standardizzazione dei sistemi di analisi. Quando si utilizzano i test per la determinazione degli anticorpi contro antigeni litiči e latenti, quasi tutti i pazienti affetti da KS e circa il 90 % degli uomini omosessuali affetti da HIV mostrano gli anticorpi HHV8 (9-14).

È stato dimostrato che l'IFA, tra i saggi sierologici, è un metodo sierologico pratico e accurato per la rilevazione e semiquantificazione degli anticorpi IgG HHV8. Per soddisfare la necessità di rilevare gli anticorpi contro antigeni litiči e latenti, SCIMEDX Corp. ha due saggi di fluorescenza indiretta per la determinazione degli anticorpi HHV8 con due tipi di vetrini per la determinazione differenziale degli anticorpi contro antigeni litiči e contro antigeni latenti.

Principio del test

I saggi con anticorpo fluorescente SCIMEDX Corp. usano il metodo indiretto per il rilevamento degli anticorpi e la determinazione del titolo. I campioni di siero o 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 contro gli antigeni dell'HHV8 forma un complesso antigene/anticorpo con gli antigeni dell'HHV8 nelle cellule infettate. Una breve fase di lavaggio permette di eliminare l'anticorpo non specifico e altre proteine sieriche che non hanno reagito. L'IgG anti-umana di capra coniugata con fluoresceina viene quindi applicata ai pozzetti del vetrino. Il coniugato anti-IgG si combina con le IgG umane presenti durante un'incubazione di 30 minuti. Dopo un breve lavaggio per rimuovere il coniugato che non ha reagito, i vetrini sono osservati in microscopia a fluorescenza. La fluorescenza verde brillante nei siti degli antigeni indica una reazione positiva dell'anticorpo.

Materiali forniti e condizioni di conservazione

Vetrini dell'antigene latente dell'HHV8: vetrini con linfociti umani che esprimono gli antigeni latenti dell'HHV8 su ogni pozzetto. Una volta tolti dal sacchetto di protezione, i vetrini sono pronti per l'uso. Conservare a 2-8 °C; in questa condizione di conservazione i vetrini sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del sacchetto.

Controllo positivo per IgG HHV8: ogni fiala contiene 0,5 ml di controllo umano positivo per anticorpo IgG HHV8. Questo reagente è un liquido pronto per l'uso. Conservare a 2-8 °C; in questa condizione di conservazione il controllo positivo liquido è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala.

Controllo negativo per IgG HHV8: ogni fiala contiene 0,5 ml di controllo umano negativo per IgG HHV8. Questo reagente è un liquido pronto per l'uso. Conservare a 2-8 °C; in questa condizione di conservazione il controllo negativo liquido è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala.

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

Mezzo di montaggio per vetrino coprioggetto: ogni fiala contiene 2,0 ml di glicerolo in tampone fosfato con ritardante della dissolvenza. Questo reagente è un liquido pronto per l'uso. La temperatura di conservazione può variare tra la temperatura refrigerata e la

temperatura ambiente (2-30 °C). Il mezzo di montaggio è stabile in entrambe le condizioni di conservazione fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala.

Soluzione salina in tampone fosfato (PBS): ogni confezione sigillata, rivestita in alluminio di tamponi in polvere dà un litro di PBS 1X. Le temperature di conservazione possono variare tra la temperatura refrigerata e la temperatura ambiente (2-30 °C). Aggiungere l'intero contenuto di una confezione di PBS a un litro di acqua distillata o deionizzata preparata al momento. Nota: per facilitare la solubilità, 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).

Precareazioni generali

Kit per il test IFA: nessuno standard di potenza U.S.

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

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

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

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

X Xn-Sostanza nociva

Precarezioni 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: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. P337+P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
Indicazione di Pericolo	H319 Provoca grave irritazione oculare.	

Raccolta dei campioni, conservazione e limiti dei campioni del test

Separare asetticamente il siero o il plasma raccolto dagli eritrociti e conservarlo congelato (a -10 °C o a temperature inferiori) fino al momento dell'analisi. Evitare di congelare e scongelare più volte.

Se si desidera, si possono conservare i campioni di siero o di plasma freschi a 2-8 °C per una settimana, senza perdita dell'attività anticorpale.

Non utilizzare campioni eccessivamente lipemici senza aver eseguito la rimozione dei lipidi.

Non utilizzare campioni contaminati.

Si dovrebbero prelevare campioni in doppio 7-14 giorni dopo, congelarli e testarli contemporaneamente per dimostrare la sieroconversione o il significativo aumento del titolo .

Materiale richiesto, ma non fornito

Provette per il test, portaprovette, pipette, piastre per micrrotitolazione e dispositivi di sicurezza per pipettare durante l'esecuzione delle diluizioni dei campioni

Incubatore a 37 °C

Camara umida per incubare i vetrini

- Porta vetrini e bacinette per il lavaggio dei vetrini
- Vetrini coprioggetto: vetrino di spessore n.1, 22 X 50 mm

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

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

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

Procedura di IFA

1. Per la determinazione qualitativa di anticorpi IgG, preparare una diluizione di analisi di 1:64 in PBS per ogni campione da testare. Preparare tutte le diluizioni in un volume minimo di 0,10 ml con PBS come diluente.
2. Per la titolazione quantitativa dei sieri, eseguire due diluizioni seriali dei campioni di siero in PBS a partire da una diluizione di 1:64, aggiungendo volumi equivalenti di siero o plasma diluito e PBS per ogni diluizione consecutiva.

- Togliere i vetrini dal sacchetto protettivo e applicare 1 goccia (circa 20 µl) di campione o campioni diluiti da analizzare per ogni pozzetto. Aggiungere volume sufficiente a coprire completamente ogni pozzetto, ma evitando di mischiare i contenuti dei diversi pozetti. Nota: ogni esecuzione del test durante la giornata richiede un pozzetto per il controllo positivo, uno per il controllo negativo e uno per la PBS (controllo del coniugato).
- Incubare i vetrini in una camera umida per 30 minuti a 37 °C.
- Risciacquare i vetrini con un flusso delicato di tampone, evitando di dirigere il flusso direttamente sui pozetti.
- Lavare i vetrini per 10 minuti cambiando la soluzione di PBS dopo 5 minuti. Agitare i vetrini muovendo il portavetri su e giù nel tampone.
- Asciugare la maschera colorata che circonda i pozetti del test con gli speciali tamponi di carta assorbente.
- Applicare una goccia del coniugato pronto per l'uso a ogni pozzetto del test.
- Ripetere i passaggi 4 (incubazione), 5 (risciacquo con PBS), 6 (lavaggio di 10 minuti in PBS) e 7 (asciugatura).
- Applicare il mezzo di montaggio a base di glicerolo e il vetrino coprioggetto da 22 x 50 mm.
- Osservare la reattività in microscopia a fluorescenza usando l'ingrandimento 20-40X. Per ottenere risultati migliori, esaminare i vetrini immediatamente dopo la conclusione del test. Per ottenere risultati equivalenti, sigillare i vetrini o conservarli in ambiente umido per evitare la disidratazione del mezzo di montaggio, conservare al buio a 2-8 °C e leggere entro 3 giorni. La reattività positiva può dare un'intensità di fluorescenza che varia dal brillante al tenue. Classificare la reazione di fluorescenza secondo la seguente scala di intensità: 4⁺ (brillante), 3⁺ (luminosa), 2⁺ (moderata), 1⁺ (tenue).

Interpretazione dei risultati

- La colorazione delle cellule infettate con una fluorescenza verde luminosa indica una reazione positiva per gli anticorpi IgG HHV8. Il pattern di fluorescenza per gli anticorpi contro gli antigeni latenti dell'HHV8 è una fluorescenza punteggiata a livello del nucleo delle cellule. Per fornire un controllo interno, ogni pozzetto del vetrino per microscopio contiene sia cellule infettate che non infettate con HHV8. La preparazione del vetrino in questo modo è intenzionale. Le cellule non infettate, colorate di rosso con colorante di contrasto, forniscono un background del contrasto. L'infettività delle cellule varia dal 50 % all'80 %. La titolazione dei sieri positivi per IgG HHV8 fornisce le informazioni quantitative. In una sequenza di titolazione, l'endpoint è rappresentato dalla diluizione più alta del siero che dimostra una reazione 1⁺.
- L'assenza di colorazione fluorescente specifica delle cellule infettate indica una reazione negativa per gli anticorpi IgG HHV8 latente.

Importanza dell'interpretazione

1. Non si riscontra alcuna fluorescenza distinguibile delle cellule infettate alla diluizione di analisi.	1. Il campione del test è negativo per gli anticorpi IgG HHV8.
2. Si riscontra fluorescenza positiva specifica delle cellule infettate alla diluizione di analisi o a diluizioni più alte.	2. Il campione del test è positivo per gli anticorpi IgG HHV8 indicando la precedente infezione con HHV8. 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 HHV8.
3. Si riscontra fluorescenza sia nei campioni infetti che in quelli non infetti.	3. Il campione del test mostra una reazione non specifica.

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

Controllo di qualità

- Per assicurare che il test funzioni in modo corretto utilizzare i controlli positivo e negativo almeno una volta per ogni analisi di una giornata.
- Il tipo e l'età del microscopio a fluorescenza e le ore di utilizzo del bulbo UV possono influire sull'intensità della fluorescenza e sugli endpoint della titolazione. Il controllo positivo per gli anticorpi HHV8 fornito con questo kit indica una reazione con intensità 2⁺-4⁺. La fiala ha un titolo elencato per l'utilizzo come ulteriore controllo del sistema di analisi (vedere la nota per la diluizione 1⁺). Utilizzarla come calibratore della reazione a intensità da 2⁺ a 4⁺ con il microscopio in uso.
- Utilizzare i controlli negativi per gli anticorpi HHV8 forniti con questo kit come calibratore per una reazione negativa con l'attrezzatura in uso.
- Ogni test della giornata deve includere un pozzetto con PBS al posto del campione del test. Questo rappresenta il controllo del coniugato per assicurare che il coniugato non reagisca con il substrato cellulare.

Nota per la diluizione 1⁺

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

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

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

Limiti della procedura

- Un test sierologico, come l'IFA, funge da ausilio nella determinazione dell'infezione virale, ma non deve essere l'unico criterio di valutazione. I risultati del test devono essere valutati insieme alle informazioni disponibili sul paziente, alla valutazione clinica e ai dati provenienti da altre procedure diagnostiche.
- Un singolo risultato positivo per gli anticorpi IgG HHV8 è significativo solo in quanto indica un contatto o un'infezione precedente con il virus. Per gli scopi epidemiologici è utile un solo risultato, ma non deve essere utilizzato come indicazione di un'infezione del virus recente o in corso. Per determinare l'infezione in corso o recente, si deve eseguire un'analisi simultanea delle coppie di campioni di plasma e di siero prelevati 7-14 giorni dopo. Un aumento di quattro volte o superiore del titolo tra il primo e il secondo campione indica un'infezione in corso o un'infezione recente.
- Nei campioni di pazienti con alcune malattie autoimmuni si possono verificare reazioni non specifiche, quali reazioni degli anticorpi antinucleari e/o reazioni degli anticorpi anticitoplasmatici. Sia le cellule infettate che quelle non infettate possono presentare

fluorescenza, nascondendo una reazione positiva per l'HHV8. Ne conseguono che l'osservazione di una reazione autoimmune non può eliminare la possibilità di infezione dell'HHV8. Nel test per l'anticorpo latente esiste la possibilità di reazioni ANA-positive che sono lette come positività per gli anticorpi latenti. Per eliminare questi risultati falsi positivi può essere utile confrontare il controllo positivo con la reazione positiva o testare i campioni con un saggio per la determinazione degli ANA.

Valori attesi

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

Caratteristiche prestazionali

Sensibilità e specificità relative

Questo kit è stato confrontato con un kit ELISA disponibile sul mercato per uso diagnostico *in vitro* per la determinazione della sensibilità e della specificità tra i due test. Lo studio ha testato 311 campioni di siero umano, costituiti da campioni di pazienti affetti da sarcoma di Kaposi, herpesvirus 6 e mielomi multipli. Sono stati inclusi anche i sieri di donatori di sangue sani. I dati sono riassunti nella tabella seguente.

IFA PANBIO

	Campioni	Stato dell'HHV8 latente	Reattivo	Non reattivo	Totale
ELISA alternativo	Sarcoma di Kaposi	Reattivo	86	16	
	Donatori di sangue	Non reattivo	0	0	102
	Mieloma multipli	Reattivo	0	1	194
	Positivi per HHV6	Non reattivo	2	191	10
					5
					Totale
			88	223	311

Concordanza sierologica: = 292/311 = 93,9 %

Riproducibilità

Quattro campioni sieropositivi con vari titoli (da 1:128 a 1:4096) e tre campioni sieronegativi sono stati diluiti serialmente due volte e analizzati quattro volte ognuno in due giorni diversi ed è stato determinato l'endpoint. Ventisette dei 28 titoli di endpoint rientravano nelle specifiche ± una doppia diluizione.

Titolo identico 23/28

± una, doppia diluizione 4/28
± due, doppia diluizione 1/28

Specificità per l'HHV8

Il test IFA per l'HHV8 latente è un test specifico per la determinazione di anticorpi HHV8. Trentaquattro dei 35 sieri positivi per l'anticorpo IgG contro citomegalovirus (CMV), virus di Epstein-Barr (EBV), virus dell'herpes umano 1 (HHV1), virus dell'herpes umano 6 (HHV6), virus della varicella-zoster (VZV) oppure qualsiasi combinazione di questi virus sono risultati negativi per l'anticorpo IgG HHV8 con questo test IFA. La tabella seguente riepiloga i dati.

Dati di reattività crociata- SCIMEDX per IgG anti-HHV8

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

Stabilità in tempo reale

L'analisi della stabilità in tempo reale dei componenti del kit è stata eseguita a intervalli di 6 mesi per un minimo di 24 mesi. I titoli di endpoint dei controlli positivo e negativo sono stati confrontati con i titoli di endpoint al rilascio. I criteri di accettabilità per entrambi sono i titoli di endpoint entro una doppia diluizione. Questi risultati rientravano nelle specifiche. Consultare la tabella seguente.

Stabilità in tempo reale

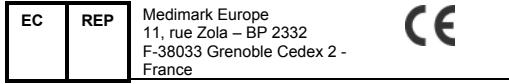
Lotto del vetrino	Controllo	Titolo di endpoint al rilascio	Titolo di endpoint a 24 mesi
#1	Positivo	1:512	1:256
	Negativo	—	—
#2	Positivo	1:512	1:512
	Negativo	—	—
#3	Positivo	1:512	1:256
	Negativo	—	—

Riferimenti bibliografici citati

- Changt, Y., E. Ceserman, M.S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D.M. Knowles, and P.S. Moore. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **265**: 1865-1869.
- Levy, J.A. 1997. Three new human herpesviruses (HHV6, 7 and 8). *Lancet* **349**: 558-562.
- Beral, V. 1996. Epidemiology of Kaposi's sarcoma, in *Cancer Surveys*, vol. 10: Cancer, HIV, and AIDS (Beral,V., Jaffe, H.W., Weiss, R.,eds) pp5-22. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Ganem, D. 1996. Human herpesvirus 8 and the biology of Kaposi's sarcoma. *Virology* **7**: 325-332.
- Luppi, M., and G. Torelli. 1996. The new lymphotropic herpesviruses (HHV-6, HHV-7, HHV8) and Hepatitis C Virus (HCV) in human lymphoproliferative diseases: an overview. *Haematologica* **81**: 265-281.
- Kim, S., S.H. Kang, J. Moon, M.S. Kim, Y.S. Kim, K. Park. 1998. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* **30**: 3165.

7. Miller, G. M. Rigsby, L. Heston, E. Grogan, R. Sun, C. Metroka, J. Levy, S-J. Gao, Y. Chang, P. Moore. 1995. Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *New Engl J Med* 334:1291-1297.
8. Lennette, E.T., D.J. Blackbourn, and J.A. Levy. 1996. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* 348: 858866.
9. Blackbourn, D.J., J. Ambroziak, E. Lennette, M. Adams, B. Ramachandran, and J.A. Levy. 1997. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor. *Lancet* 349: 609-611.
10. Simpson, G.R., T.F. Schultz, D. Whitby, P.M. Cook, C. Boshoff, L. Rainbow, M.R. Howard, S.Gao, R.A. Bohenzky, P. Simmonds, C. Lee, A. de Ruiter, A. Hatzakis, R.S. Tedder, I.V.D. Weller, R.A Weiss, and P.S. Moore. 1996. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* 349: 1133-38.
11. Kedes, D.H., D. Ganem, N. Ameli, P. Baccetti, and R. Greenblatt. 1997. The prevalence of serum antibody to human herpesvirus 8 (Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus) among HIV-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. *JAMA* 277: 478-481.
12. Kedes, D.H., E. Operksalski, M. Busch, K. Kohn, J. Flood, D. Ganem. 1996. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Med.* 2: 918-921.
13. Martin, J.N., D.Ee. Ganem, D.H. Osmond, K.A. Page-Shafer, D. Macrae, and D.H. Kedes. 1998. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *New Engl. J Med.* 338: 948-54.
14. Chatlynne, L.G., W. Lapps, M. Handy, Y.Q. Huang, R. Masood, A.S. Hamilton, J.W. Said, H.P. Koeffler, M.H. Kaplan, A. Friedman-Kien, P.S. Gill, J.E. Whitman, and D.V. Ablashi. 1998. Detection and titration of human herpesvirus-8 specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 92: 53-58.

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





FLUORESCÊNCIA INDIRECTA PARA ANTICORPOS IgG PARA O HERPESVÍRUS HUMANO 8 (HHV8 LATENTE)

Somente para exportação

Somente para utilização em diagnóstico *in vitro*.

I-HV801G 120 Tests
I-HV803G 40 Tests

Utilização

O ensaio de fluorescência Indireta (IFA) da SCIMEDX para anticorpos IgG para o抗ígeno humano Herpesvírus 8 (HHV8 Latente) destina-se à detecção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos IgG (Imunoglobulina G) para抗ígenos HHV8 latentes em soro ou plasma humano. A detecção de anticorpos IgG HHV8 no humano pode ser utilizada como auxiliar no diagnóstico de infecção primária ou reactivação/reinfecção com este vírus, ou pode ser evidência de infecção HHV8 prévia.

Introdução e Sumário do Procedimento

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

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

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

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

Princípio do Teste

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

Material Fornecido e Condições de Armazenamento

Lâminas de Antígeno HHV8-Latente: Lâminas de linfócitos humano a expressar抗ígenos HHV8 latentes em cada poço. As lâminas estão prontas a usar após serem retiradas da embalagem de protecção. Armazenar a 2-8°C. As lâminas são estáveis nestas condições até à data de validade marcada no rótulo da embalagem.

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

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

Conjugado de Fluoresceína: Cada frasco contém 1.5ml de IgG (cadeias leves e pesadas) anti-humana de cabra (inactivada) conjugada a fluoresceína com Evans Blue e Rodamina. O conjugado de fluoresceína é uma conjugação de IgG anti-humana purificada por cromatografia de afinidade com isocianato de fluoresceína (FITC). A adição de Evans Blue e Rodamina ao conjugado obvia a fluorescência não específica das células de cultura de tecido. Este componente está pronto a usar líquido. Armazenar a 2-8°C. O conjugado líquido é estável nestas condições até à data de validade marcada no rótulo do frasco.

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

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

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

Precauções Gerais

Kit Teste IFA: No US Standard of Potency.

- Armazenar todos os componentes do kit às temperaturas recomendadas ou sugeridas. Não congelar.
- Não utilizar os componentes para além das datas de validade correspondentes.
- A SCIMEDX optimiza todos os componentes ativos de cada lote dos seus kits IFA como uma unidade. Não misturar componentes de lotes diferentes ou de origem diferente.
- Os controlos e conjugado contêm 0.095% de azida sódica que, se acumulada, pode formar compostos explosivos nas canalizações. Passar por água abundante ao eliminar estes materiais.
- 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 fúngica.

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

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

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

Xn-Substância Nociva

Precaução de segurança para controlos e conjugado:

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

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

Colheita da Amostra, Armazenamento e Limitações das Amostras

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

Material Adicional Necessário

- Tubos teste, suportes, pipetas, placas de microtitulação e dispositivos de pipetagem para as diluições das amostras.
- Incubadora de 37°C
- Câmara húmida para incubação das lâminas
- Suporte de lâminas e recipiente para lavagem das lâminas.
- Lamelas: 22 X 50 mm espessura do vidro No. 1

Microscópio de fluorescência: Para calibrar os controlos e conjugado foi utilizado um microscópio de fluorescência equipado com o seguinte

- ocular 10X
- objectivas 16X ou 40X
- Epi-iluminador com lâmpada de halogénio de 50W
- Filtro de excitação FITC KP490
- Filtro de absorção amarelo K530
- Filtro de supressão vermelho BG38

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

Procedimento IFA

1. Para a determinação qualitativa de anticorpos IgG, preparar uma diluição de desipse de 1:64 em PBS para cada amostra. Preparar todas as diluições num volume mínimo de 0.10ml com PBS como diluente.
2. Para a titulação quantitativa dos soros, preparar uma diluição seriada da amostra em PBS, partindo da diluição 1:64 e adicionando igual volume de soro ou plasma diluído e PBS para cada diluição consecutiva.
3. Retirar as lâminas das suas embalagens e aplicar 1 gota (cerca de 20 µl) de amostra(s) diluída(s) a cada poço. Adicionar suficiente volume para cobrir completamente cada poço, evitando a mistura do conteúdo entre os poços.
4. Incubar as lâminas em câmara humida durante 30 minutos a 37°C.

5. Enxagar as lâminas com uma leve corrente de tampão. Evitar dirigir o fluxo directamente para os poços.
6. Lavar as lâminas durante 10 minutos com uma muda de PBS após 5 minutos. Agitar as lâminas movendo o suporte no PBS.
7. Absorver a superfície que envolve os poços com os blotters especiais.
8. Aplicar uma gota de conjugado pronto a usar a cada poço.
9. Repetir os passos 4 (incubação), 5 (enxaguamento com PBS), 6 (10 minutos de lavagem em PBS), e 7 (blot).
10. Aplicar o meio de montagem e a lamela de vidro 22 X 50 mm
11. Observar a reactividade ao microscópio de fluorescência com uma magnificação de 20-40X. Para melhores resultados, examinar as lâminas imediatamente após o témino do teste. Para obtenção de resultados equivalentes selar as lâminas ou mantê-las húmidas para minimizar a desidratação do meio de montagem, armazenar no escuro a 2-8°C, e ler em três dias. A reactividade positiva pode variar na intensidade da fluorescência de brilhante a fraca. Classificar a reacção de fluorescência de acordo com a seguinte escala de intensidade: 4⁺ (brilhante), 3⁺ (clara), 2⁺ (moderada) e 1⁺ (fraca).

Interpretação dos Resultados

- Uma marcação verde-fluorescente brilhante das células infectadas mostra uma reacção positiva para anticorpos IgG HHV8. O padrão de marcação fluorescente para anticorpos para antígenos HHV8 latentes são partículas fluorescentes no núcleo das células. Como controlo interno, cada poço na lâmina contém células infectadas e não infectadas. A preparação da lâmina desta forma é intencional. As células não infectadas, coradas de vermelho, fornecem um fundo contrastante. A infeciosidade das células varia entre 50-80%. A titulação dos soros IgG HHV8 positivos dará informação quantitativa. Na série de titulações, a maior diluição de soro a demonstrar uma reacção 1⁺ é interpretada como o título final.
- A ausência de marcação fluorescente específica das células infectadas mostra uma reacção negativa para anticorpos IgG latentes para HHV8.

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

Significado da Interpretação

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

Controlo de Qualidade

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

Nota de Diluição 1^{*}

O controlo positivo deste kit está pronto a usar líquido que apresenta uma intensidade de fluorescência de 2⁺ a 4⁺ quando testado. Para obter uma intensidade de fluorescência de 1⁺, fazer diluições seriadas ao título indicado no frasco incluído no kit. Titular o controlo positivo no início da utilização do kit.

O título obtido no teste pode diferir da diluição listada devido a uma série de razões técnicas. É melhor testar o título indicado no frasco, bem como as diluições imediatamente antes e depois do título listado. É normal que os resultados obtidos de um título final (1⁺) difiram entre laboratórios devido a factores que afectam a intensidade da fluorescência. Estes factores incluem:

1. a potência da fonte de luz UV no microscópio
2. tipo de fonte de luz
3. idade da lâmpada
4. extensão do padrão óptico de microscópio e os tipos de filtros ópticos usados
5. rigor das técnicas de diluição e do equipamento de diluição

Limitações do Procedimento

1. Um teste serológico como um IFA serve como auxiliar na detecção de infecção viral mas a sua utilização não deve ser o único critério. Os resultados do teste devem ser usados em conjunto com informação disponível sobre o doente, avaliação clínica e outros procedimentos de diagnóstico disponíveis.
2. Um único resultado positivo para anticorpos IgG HHV8 significa apenas uma indicação de contacto prévio ou infecção com o vírus. Para fins epidemiológicos um único resultado é útil. Contudo, não deve ser usado como uma indicação de infecção actual ou recente com o vírus. Para determinar uma infecção actual ou recente, deve ser feito um teste simultâneo com pares de amostras de soro ou plasma colhidos com 7-14 dias de intervalo. Um aumento de título superior ou igual a quatro vezes entre a primeira e segunda amostra é indicativo de uma infecção actual ou recente.
3. Em amostras de doentes com certas doenças autoimunes podem ocorrer reacções positivas não específicas como reacções de anticorpos antinucleares e/ou anticoplasmáticos. Quer as células infectadas quer as não infectadas vão apresentar fluorescência o que pode obscurecer uma reacção HHV8 positiva. Assim, a observação de uma reacção autoimune não pode eliminar a possibilidade de uma infecção HHV8. No teste para anticorpo latente, existe a possibilidade de uma reacção positiva para ANA ser lida como positiva para

anticorpo latente. A comparação com o controlo positivo ou testar a amostra num teste específico para ANAs pode ser útil para eliminar falsos positivos.

Valores Esperados

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

Características de Performance

Sensibilidade e Especificidade Relativas

Este kit foi comparado com um ELISA disponível comercialmente para utilização em diagnóstico *in vitro* para determinar a sensibilidade e especificidade entre os dois testes. O estudo testou 311 amostras séricas que consistiam de amostras de doentes com sarcoma de Kaposi, Herpes Virus Humano 6 e mielomas múltiplos. Também foram incluídos soros de dadores de sangue normais. Os dados estão sumarizados na seguinte tabela.

SCIMEDX IFA

	Amostras	Estado HHV8 Latente	Reactivos	N Não reactivos	Total
ELISA	Sarcoma de Kaposi	Reattivo	86	16	102
	Non reattivo	0	0		
	Dadores de sangue	Reattivo	0	1	194
	Non reattivo	2	191		
	Mielomas múltiplos	Reattivo	0	0	10
	Non reattivo	0	10		
HHV6 Positivo	Reattivo	0	0	5	
	Non reattivo	0	5		
Total			88	223	311

Concordância serológica: =292/311 = 93.9%

Reprodutibilidade

Foram feitas diluições seriadas em quatro amostras seropositivas com vários títulos (1:128 to 1:4096) e três amostras seronegativas e testadas quatro vezes em dois dias diferentes ao título final determinado. Vinte e sete dos vinte e oito títulos finais estiveram dentro da especificação

Título idêntico 23/28

± um, diluição seriada 4/28
± dois, diluição seriada 1/28

Especificidade HHV8

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

Reactividade Cruzada-SCIMEDX HHV8 IgG

Doença	Total de amostras	Resultado Positivo
CMV	6	1/6
EBV	21	0/21
HSV1	1	0/1
HHV6	6	0/6
VZV	1	0/1
Total	35	1/35

Estabilidade em tempo real

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

Estabilidade em Tempo real

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

Literatura Citada

1. Chang, Y., E. Cesarman, M.S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D.M. Knowles, and P.S. Moore. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **265**: 1865-1869.
2. Levy, J.A. 1997. Three new human herpesviruses (HHV-6, 7 and 8). *Lancet* **349**: 558-562.
3. Beral, V. 1998. Epidemiology of Kaposi's sarcoma, in *Cancer Surveys*, vol. 10: Cancer, HIV, and AIDS (Beral, V., Jaffe, H.W., Weiss, R., eds) pp-22. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
4. Ganem, D. 1996. Human herpesvirus 8 and the biology of Kaposi's sarcoma. *Virology* **7**: 325-332.
5. Luppi, M., and G. Torelli. 1996. The new lymphotropic herpesviruses (HHV-6, HHV-7, HHV8) and Hepatitis C Virus (HCV) in human lymphoproliferative diseases: an overview. *Haematologica* **81**: 265-281.
6. Kim, S., S.H. Kang, J. Moon, M.S. Kim, Y.S. Kim, K. Park. 1998. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* **30**: 3165.
7. Miller, G. M., Rigsby, L., Heston, E., Grogan, R., Sun, C., Metroka, J., Levy, S.-J., Gao, Y., Chang, P., Moore. 1995. Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *New Engl J Med* **334**: 1291-1297.
8. Lennette, E.T., D.J. Blackbourn, and J.A. Levy. 1996. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* **348**: 858-866.
9. Blackbourn, D.J., J. Ambroziak, E. Lennette, M. Adams, B. Ramachandran, and J.A. Levy. 1997. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor. *Lancet* **349**: 609-611.
10. Simpson, G.R., T.F. Schultz, D. Whitby, P.M. Cook, C. Boshoff, L. Rainbow, M.R. Howard, S.Gao, R.A. Bohenzky, P. Simmonds, C. Lee, A. de Ruiter, A. Hatzakis, R.S. Tedder, I.V.D

- Weller, R.A Weiss, and P.S. Moore.** 1996. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* **349:** 1133-38.
11. **Kedes, D.H., D. Ganem, N. Ameli, P. Bacetti, and R. Greenblatt.** 1997. The prevalence of serum antibody to human herpesvirus 8 (Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus) among HIV-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. *JAMA* **277:** 478-481.
 12. **Kedes, D.H., E. Operalski, M. Busch, K. Kohn, J. Flood, D. Ganem.** 1996. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus); distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Med.* **2:** 918-921.
 13. **Martin, J.N., D.E. Ganem, D.H. Osmond, K.A. Page-Shafer, D. Macrae, and D.H. Kedes.** 1998. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *New Engl. J Med.* **338:** 948-54.
 14. **Chatlynne, L.G., W. Lapps, M. Handy, Y.Q. Huang, R. Masood, A.S. Hamilton, J.W. Said, H.P. Koeffler, M.H. Kaplan, A. Friedman-Kien, P.S. Gill, J.E. Whitman, and D.V. Ablashi.** 1998. Detection and titration of human herpesvirus-8 specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* **92:** 53-58.

 SCIMEDIX CORPORATION
53 Richboynton Rd
Dover, NJ 07801 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8795
www.scimedix.com

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



	Manufactured by Prodotto da Fabricado por Fabriqué par hergestellt von
REF	Catalog number Número de catalogo Número de Catálogo Numéro de catalogue Katalognummer
LOT	Lot Lotto Lote Lot Charge
EC REP	EC Authorized Representative Rappresentante Autorizzato CE Representante Autorizado CE CE Représentant autorisé EG autorisierter Bevollmächtigter
CE	EC Declaration of Conformity Dichiarazione di Conformità CE Declaración de Conformidad CE CE Déclaration de Conformité EG Konformitätserklärung
	Number of tests Número di test Número de determinaciones Nombre de tests Anzahl der Teste
	See instructions for use Vedere le istruzioni per l'uso Consultar la instrucciones de uso Voir instructions Gebrauchsweisung beachten
	Expiration date Data di scadenza Caducidad Date d'Expiration Haltbarkeitsdatum
	Store at 2-8 °C / 35-46 °F Conservare a 2-8°C/35-46 F Almacenar a 2-8°C / 35-46°F Conserver à 2-8°C Bei 2-8°C / 35-46°F lagern
	Caution Attenzione Precaución Précautions Achtung
	Xn-Harmful Substance. Refer to Material Safety Data Sheet Substance nocive (Xn). Voir la fiche sur la sécurité des équipements. Xn – gefährlicher Stoff Siehe Sicherheitsdatenblatt. Xn-Sostanza nociva. Fare riferimento alla Scheda di sicurezza. Xn - Sustancia dañina. Consultar la Hoja de Datos de Seguridad del Material.
	Potential biological risk Potenziale rischio biologico Riesgo potencial biológico Biohazard Potentielle biologische Gefährdung
RFU	Ready for use Pronto all'uso Listo para su uso Prêt à l'emploi Gebrauchsfertig

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