

**ČEŠTINA**

Kat. čís. V17HHV6  
Formát: 4 x 10 well slides  
HHV-426-03



**Lidský herpes virus-6  
Imunofluorescenční stanovení IgM**

Imunofluorescenční zkouška k detekci protilátek IgM proti lidskému herpes viru-6



## **OBSAH**

### **Zamýšlené použití**

#### **Úvod**

#### **Principy testu**

#### **Bezpečnostní opatření**

##### **Bezpečnost**

##### **Postup**

#### **Obsah kitu**

##### **Dodané materiály**

##### **Další požadované materiály**

#### **Skladování a stabilita**

#### **Sběr a skladování vzorků**

#### **Příprava reagensů a vzorků**

#### **Pracovní postup**

#### **Interpretace výsledků**

#### **Signifikance interpretace**

#### **Kritéria kontroly kvality**

#### **Očekávané hodnoty**

#### **Omezení použití**

#### **Výkonové charakteristiky**

#### **Shrnutí postupu HHV- 6 IgM IFA**

#### **Odkazy na literaturu**

#### **Interpretace symbolů**

#### **Další výrobky Biotrin**

## Zamýšlené použití

Biotrin Human Herpesvirus-6 IgM IFA je určen pro kvalitativní a semikvantitativní detekci protilátek IgM proti lidskému herpes viru-6 (HHV-6) v séru a plazmě.

## Úvod

Lidský herpes virus-6 (HHV-6) byl poprvé popsán v roce 1986. Byl izolován u pacientů trpících lymfoproliferativními poruchami. Následně byl HHV-6 potvrzen jako etiologické agens způsobující dětskou chorobu exanthem subitum (Roseola infantum) a byl spojován s řadou dalších chorobných projevů u dětí včetně fulminantní hepatitidy<sup>(3)</sup>, encefalitidy<sup>(4)</sup>, histiocytické nekrotizující lymfadenitidy<sup>(5)</sup> a fatálních diseminovaných infekcí<sup>(6)</sup>.

U dospělých je primoinfekce HHV-6 méně běžná a dokumentovaná evidence ukazuje, že HHV-6 může být přítomen u případů hepatitidy<sup>(7)</sup>, onemocnění podobnému mononukleóze<sup>(8)</sup>, atypické polyklonální lymfoproliferace<sup>(9)</sup>, syndromu povirové chronické únavy<sup>(10)</sup>, sklerózy multiplex<sup>(11)</sup>, karcinomu v dutině ústní<sup>(12)</sup>, karcinomu děložního<sup>(13)</sup> krčku a suprese kostní dřeně u pacientů s transplantací kostní dřeně<sup>(14)</sup>.

Při virologických a serologických zkouškách bylo zjištěno, že HHV-6 je v lidské populaci všudypřítomen, přičemž infekce se typicky vyskytuje v raném dětství a malý počet dospělých zůstává náchylných k primoinfekci. Hlášená prevalence protilátek je vyšší než 80% u pacientů starších 2 let<sup>(15)</sup>. Avšak i když výskyt protilátek proti HHV-6 je vysoký, hladina protilátek se snižuje po infekci na nízké titry. Detekce protilátek IgM proti HHV-6 u lidí může být použita jako pomůcka k diagnostikování primoinfekce tímto virem.

## Principy testu

Systém Biotrin HHV-6 IFA používá nepřímé imunofluorescenční metody detekce protilátek a stanovení titru. Vzorky séra pacienta nebo plazmy jsou inkubovány s imobilizovaným antigenem HHV-6, který byl stabilizován na mikroskopickém sklíčku. Jestliže protilátky IgM proti viru HHV-6 jsou ve vzorku přítomny, vytvoří se s tímto antigenem stálý komplex. Komplex je následně vizualizován přidávkem kozí protilátky proti lidským IgM konjugované s fluoresceinem. Pozitivní reakce protilátek je viditelná ve fluorescenčním mikroskopu jako jasně zelená fluorescence.

## Bezpečnostní opatření

### Bezpečnost

- Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
- Tento kit může používat výlučně kvalifikovaný laboratorní personál.
- Kit obsahuje materiál lidského původu, který je považován za POTENCIÁLNĚ BIOLOGICKY NEBEZPEČNÝ MATERIÁL. Byly testovány kontrolní vzorky a bylo zjištěno, že jsou negativní na HBsAg a protilátky proti HIV 1 / 2, HTLV-I/II a HCV. Jelikož však žádná zkušební metoda nemůže nabídnout naprostou jistotu nepřítomnosti viru, pracujte s těmito kontrolními vzorky jako s potenciálně infekčními.
- Některé reagenty obsahují Thiomersal, který může být při požití toxický.
- Vyhněte se kontaktu s Evansovou modří, jelikož je to potenciální karcinogen. Dojde-li k dotyku s pokožkou, omyjte povrch velkým množstvím vody.
- Některé reagenty obsahují azid sodný, který může vytvářet potenciálně výbušně azidy kovů při styku s oloveným a měděným potrubím. Při likvidaci je nutno reagentie spláchnout velkým množstvím vody, aby se zabránilo vzniku azidů.

- Likvidujte veškeré klinické vzorky, infikovaný nebo potenciálně infikovaný materiál podle stanovených laboratorních zásad. S veškerými materiály je nutno zacházet a likvidovat je, jako by byly potenciálně infekční.
- Zbytky chemikálií, přípravků a součástí kitu jsou zpravidla považovány za nebezpečný odpad.
- Veškeré takovéto materiály je nutno likvidovat podle stanovených bezpečnostních postupů.
- Při manipulaci se vzorky a při provádění zkoušky používejte ochranný oděv, latexové rukavice na jedno použití a ochranu očí. Po skončení práce si důkladně umyjte ruce.
- Nepipetujte materiály ústy a nikdy nejezte a nepijte u laboratorního stolu.

### **Postup**

- Nepoužívejte kit ani jednotlivé reagenty po jejich datu expirace.
- Nekombinujte reagenty z kitů s různými čísly šarží.
- Nepoužívejte kontaminované vzorky nebo reagenty.
- Odchytky od tohoto protokolu mohou vést k mylným výsledkům.
- Provádění zkoušky mimo časové a teplotní rozsahy může vést k mylným výsledkům. Zkoušky prováděné mimo stanovené časové a teplotní rozsahy musí být opakovány.
- Požaduje se vysoká kvalita destilované nebo deionizované vody na ředění koncentrovaného promývacího pufru. Použití nekvalitní nebo kontaminované vody může vést k neúspěchu. Zajistěte, aby byl důkladně promíchán promývací koncentrovaný pufr.
- Vytemperujte všechny reagenty na pokojovou teplotu (20-25°C) a před použitím je dobře promíchejte.
- Nevyjímajte mikroskopická sklíčka z jejich ochranného obalu dříve, než je budete používat. Umožněte, aby se mikroskopická sklíčka temperovala na teplotu místnosti a teprve potom otevřete jejich ochranný obal, aby se tak ochránila proti kondenzaci.
- Nenechávejte po dlouhou dobu reagenty na přímém slunci a/nebo při teplotě nad 2-8°C
- Při barvení většího množství vzorků zabraňte křížové kontaminaci mezi vzorky tím, že jamky od sebe oddělíte voskovou tužkou.
- Použití většího množství upevňovacího média může způsobit rozmazanou fluorescenci.
- Vždycky používejte pro přípravu reagentů čisté skleněné nádoby, nejlépe na jedno použití.
- Je nutno dávat pozor, aby nedošlo ke kontaminaci složek soupravy, pro pipetování vzorků a reagentů používejte vždy čisté špičky.
- Nepoškrabejte jamky špičkou pipety nebo kapátka.
- Dříve než se zkouškou začnete, je nutno vypracovat plán identifikace a distribuce.

## Obsah kitu

### Dodané materiály

1. Mikroskopická sklíčka s antigenem HHV-6.  

SLIDE
-------

 4 sklíčka x 10 jamek se stabilizovanými lidskými lymfocyty infikovanými HHV-6. Sklíčka jsou po vyjmutí z ochranného obalu připravena k upotřebení.
2. Pozitivní kontrolní vzorek<sup>\*\*</sup>:  

CONTROL	+	IgM
---------	---	-----

 1 x 0,5ml pozitivního kontrolního vzorku protilátky IgM proti HHV-6 Obsahuje 0,1 % azidu sodného (připraven k upotřebení) (modré víčko).
3. Negativní kontrolní vzorek<sup>\*\*</sup>:  

CONTROL	-	IgM
---------	---	-----

 1 x 0,5ml negativního kontrolního vzorku protilátky IgM proti HHV-6. Obsahuje 0,1 % azidu sodného (připraven k upotřebení) (červené víčko).
4. Konjugát fluoresceinu <sup>\*\*</sup>  

CONJ	ENZ	1X
------	-----	----

 1 x 1,5ml koziho antilidského IgM konjugovaného fluoresceinem s Evansovou modří a rhodaminovými kontrastními barvivy. Obsahuje 0,1 % azidu sodného. (připraven k upotřebení) (žluté víčko).
5. Montovací médium:  

MM
----

 1 x 2ml tris-pufrovaný glycerol. Obsahuje Thiomersal (0,01%). (připraven k upotřebení) (oranžové víčko).
6. Promývací koncentrovaný pufr (PBS):  

BUF	WASH	CONC
-----	------	------

 1x sáček. 10 tablet PBS v uzavíratelném sáčku z hliníkové folie. Z každé tablety se připraví 100ml 1 x koncentrovaného promývacího pufru.
7. Savé papíry na sklíčka (blottery):  

BLT
-----

 4x savé papíry s předem připravenými otvory na sušení masky podložního sklíčka mikroskopu.

8. Návod k použití.



<sup>\*\*</sup> Potenciálně biologicky nebezpečný materiál.

### Další požadované materiály

- Zařízení na sběr séra.
- Držák na podložní sklíčka mikroskopu a barvicí miska pro umývání sklíček.
- Vysoce kvalitní destilovaná nebo deionizovaná voda.
- Čisté odměrné laboratorní nádoby.
- Zkumavky nebo ekvivalent pro přípravu vzorků.

- Odměrné válce.
- Přesné pipety, mikropipety a špičky na jedno použití k pipetování 5µl až 50µl a 50µl až 200µl.
- Minutka.
- Inkubátor 35-39°C.
- Papírové ručníky nebo savý papír.
- Zkumavky na ředění vzorků a zkumavky do miniodstředivky (0,5 ml).
- Stolní miniodstředivka.
- Inkubační miska obsahující navlhčený hedvábný papír.
- Stříčka a promývací vanička.
- Mikroskopická krycí sklíčka: Tloušťka 22 X 50mm čís. 1.
- Vosková tužka.
- Činidlo pro adsorpci IgG (komerčně dostupné).
- Fluorescenční mikroskop s odpovídající kombinací filtrů pro FITC (excitační filtr 495nm, bariérový filtr 515nm), doporučuje se zdroj halogenového světla. Fluoresceinový štítek má excitační pík 49nm a emisní pík 520nm. Rozdíly v konečné reaktivitě a fluorescenčních intenzitách mohou být způsobeny typem a stavem fluorescenčního zařízení, které se ve vaší laboratoři používá.

### **Skladování a stabilita**

- Kit je stabilní až do data expirace uvedeného na štítku vnější krabičky za předpokladu, že je uložena při teplotě 2-8°C. Poznámka: Savé papíry mohou být skladovány při teplotě 2-25°C.
- Nepoužité součásti je nutno vrátit do skladu o teplotě 2-8°C bezprostředně po jejich použití.
- Rekonstituovaný promývací pufr je stabilní až po dobu 4 týdnů, je-li skladován při teplotě 2-8°C.

### **Sběr a skladování vzorků**

- Vzorky je nutno získat za použití aseptických laboratorních technik. Vzorky je možno skladovat až po dobu 1 týdne při teplotě 2-8°C a po delší dobu při teplotě -20°C. Je nutno se vyhnout opětovnému zmrazování a rozmrazování.
- Nepoužívejte nadměrně lipemické vzorky bez delipidizace.
- Nepoužívejte kontaminované vzorky.

### **Příprava reagensů a vzorků**

Připravte promývací pufr přidáním 1 tablety PBS do 100ml čerstvě připravené nebo deionizované vody. Promíchejte, aby se tableta rozpustila. Skladujte v čisté uzavřené nádobě při teplotě 2-8°C až po dobu 4 týdnů.

Všechny ostatní reagensie se dodávají hotové a připravené k upotřebení a v pracovním zředění.

## **Příprava vzorků**

Kvalitativní zkouška: Všechny vzorky předem upravte, aby se odstranily IgG. Přidejte 90 $\mu$ l adsorpčního činidla do 10 $\mu$ l testovaného vzorku a dobře promíchejte. Inkubujte po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Odstředějte při rychlosti 10 000 ot./min po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Supernatant nakápněte na podložní sklíčko mikroskopu.

Semikvantitativní zkouška: „Titr“ vzorku je možno stanovit tak, že se připraví série dvojnásobného ředění vzorku v promývacím pufru, přičemž se započne s ředěním vzorku v poměru 1 : 20 v adsorpčním činidle; pro přípravu každého následného ředění se smísí vždy stejný objem zředěného vzorku a promývacího pufru. Ředění se provádí tak dlouho, dokud se nedosáhne fluorescence stupně „+1“ (viz „Interpretace výsledků“).

## **Pracovní postup**

Před použitím vytemperujte všechny vzorky na pokojovou teplotu (20-25°C).

- 1. Příprava podložních sklíček mikroskopu.**

Vyjměte požadovaný počet podložních sklíček z ochranného obalu a označte místa mezi jamkami voskovou tužkou, aby se tak zabránilo kontaminaci. Aplikujte 1 kapku (asi 20 $\mu$ l) každého zředěného testovaného vzorku a 1 kapku (asi 20 $\mu$ l) pozitivního a negativního kontrolního vzorku na očíslované jamky.  
Poznámka: Aplikujte dostatečné množství, aby se každá jamka naplnila, nedopusťte však smíchání obsahu mezi jednotlivými jamkami.
- 2. Vzorky inkubujte.**

Inkubujte podložní sklíčko ve vlhké komoře pro dobu 3 hodin při teplotě 35-39°C.
- 3. Umyjte podložní sklíčko.**

Opláchněte podložní sklíčka podél okraje slabým proudem promývacího pufru za použití stříčky. Proud nesměřujte na jamky. Položte sklíčka do promývací misky obsahující promývací pufr na dobu 10 minut při pokojové teplotě (20 - 25°C) a po 5 minutách promývací pufr vyměňte. Osušte okolí zkušebních jamek dodanými savými papíry.
- 4. Inkubujte s konjugátem.**

Přidejte 1 kapku (asi 20 $\mu$ l) konjugátu připraveného k upotřebení do každé testovací jamky. Inkubujte sklíčka ve vlhké komoře po dobu 30 minut při teplotě 35-39°C.
- 5. Umyjte podložní sklíčko.**

Opakujte Krok 3.
- 6. Aplikujte montovací médium.**

Aplikujte 1 malou kapku montovacího média do středu každé jamky a přiložte krycí sklíčko.
- 7. Prohlédněte sklíčko.**

Prohlédněte je ve fluorescenčním mikroskopu při 200-500x zvětšení. Nejlepších výsledků se dosáhne, prohlédnete-li sklíčka okamžitě po ukončení zkoušky. (Abyste dosáhli ekvivalentních výsledků, sklíčka zabalte nebo je udržujte zavlhčená, abyste tak minimalizovali vysychání montovacího média. Ukládejte v temnu při teplotě 2-8°C. Odečtěte do 3 dnů).
- 8. Klasifikace.**

Pozitivní reaktivita se může pohybovat ve fluorescenční intenzitě od brilantní po slabou. Klasifikujte fluorescenční reakci podle následující stupnice intenzity: +4 (brilantní), +3 (jasná), +2 (mírná), +1 (slabá).

## Interpretace výsledků

### Negativní reakce:

Vzorek se považuje za negativní na přítomnost protilátek IgM proti viru HHV-6, jestliže nelze pozorovat fluorescenční zbarvení infikovaných buněk.

### Pozitivní reakce:

Pozitivní reakce na protilátky proti HHV-6 se udává pouze v případě, že lze pozorovat v infikovaných buňkách jasně zelenou fluorescenci při zředění  $\geq 1:20$ . Pozitivní reakce indikuje primoinfekci HHV-6.

+4 = brilantní zelená fluorescence indikuje velmi vysoký titr reakce protilátek IgM proti HHV-6.

+3 = jasná zelená fluorescence indikuje vysoký titr reakce protilátek IgM proti HHV-6.

+2 = zelená fluorescence indikuje střední titr reakce protilátek IgM proti HHV-6.

+1 = matně zelená fluorescence indikuje slabý titr reakce protilátek IgM proti HHV-6. Rovněž indikuje konečné ředění daného vzorku.

- Titrace HHV-6 IgM pozitivních vzorků poskytuje kvantitativní informace. V řadě titrací se nejvyšší rozředění séra vykazující reakci „+1“ interpretuje jako konečný titr.
- Aby se zajistila interní kontrola, každá jamka na mikroskopickém sklíčku obsahuje jak buňky infikované HHV-6, tak i buňky neinfikované. Příprava mikroskopického sklíčka tímto způsobem je záměrná. Neinfikované buňky zbarvené kontrastním barvivem červeně poskytují kontrastní pozadí.
- Charakter fluorescenčního zbarvení buněk infikovaných HHV-6 je proměnný. Podle stupně infekce buňky se může charakter zbarvení měnit od fluorescence malé části infikované buňky až po fluorescenci celé buňky. Fluorescence se může rovněž pohybovat od zrnité po homogenní.

## Signifikance interpretace

U skriningového ředění není zjištěna žádná rozeznatelná fluorescence infikovaných buněk.	Testovaný vzorek je negativní na přítomnost protilátky IgM proti HHV-6.
U skriningového ředění nebo při vyšším zředění byla zjištěna specifická pozitivní fluorescence infikovaných buněk.	Testovaný vzorek je pozitivní na přítomnost protilátek třídy IgM proti HHV-6, což indikuje běžnou infekci.
Zjištěná fluorescence jak u infikovaných tak i neinfikovaných buněk	Testovaný vzorek vykazuje nespecifickou reakci.

### Kritéria kontroly kvality

Každá zkouška musí obsahovat pozitivní kontrolní vzorek a negativní kontrolní vzorek  
Výsledky zkoušky jsou považovány za validní, jsou-li splněna následující kritéria:

- 1) Kontrolní vzorek pozitivní na IgM proti HHV-6 dodaný s tímto kitem dává fluorescenční intenzitu infikované buňky  $\geq +2$ .
- 2) Kontrolní vzorek negativní na IgM proti HHV-6 dodaný s tímto kitem nedává žádnou specifickou fluorescenční intenzitu infikované buňky.

Nejsou-li výše uvedená kritéria splněna, zkouška se považuje za nevalidní a musí být opakována.

### Očekávané hodnoty

Prevalence protilátek proti HHV-6 je u pacientů starších 2 let vyšší než 80%. I když je prevalence vysoká, titer protilátek proti HHV-6 se po infekci snižuje na nízké hodnoty. Vysoká hladina IgM může tudíž naznačovat primární infekci.

### Omezení použití

- Sérologický test jako IFA slouží jako pomůcka k detekci virové infekce, jeho použití by však nemělo být jediným kritériem. Výsledky testu by měly být porovnány s pacientovým klinickým a epidemiologickým profilem a s dalšími klinickými laboratorními výsledky.
- Nespecifické pozitivní reakce jako jsou reakce protilátek proti buněčným jádrům vlastních buněk a/nebo anticytoplazmových protilátek se mohou vyskytovat ve vzorcích od pacientů s jistými autoimunními chorobami. Jak infikované tak i neinfikované buňky mohou fluoreskovat, což může pozitivní reakci překrýt. Zjištění autoimunní reakce nemůže tedy vyloučit možnost infekce HHV-6.
- Vzorek získaný příliš brzy v průběhu infekce nemusí obsahovat detekovatelné hladiny protilátek třídy IgM. Je-li podezření na virovou infekci, je nutno odebrat po 7-14 dnech druhý vzorek. Druhý vzorek je nutno testovat souběžně s prvním vzorkem, aby se zjistila tvorba protilátek v séru nebo signifikantní vzestup titru virové specifické protilátky třídy IgM a IgG. Tvorba protilátek v séru nebo signifikantní vzestup v titru indikuje primární infekci.
- Jelikož existuje možnost kontaminace pupečnickové krve mateřskou IgM, je vhodné potvrdit pozitivní výsledky virových protilátek třídy IgM na vzorcích pupečnickové krve testováním následného vzorku od dítěte, nejlépe v průběhu prvních 5 dnů jeho života.
- Specifické protilátky třídy IgM se zpravidla detekují u pacientů s nedávnou primární infekcí. Protilátky třídy IgM mohou být zjištěny u pacientů s reaktivovanými nebo sekundárními infekcemi.
- Biotrin doporučuje předběžnou úpravu zkušebních vzorků, aby se protilátky třídy IgG odstranily. Tímto dalším krokem navíc napomůžeme k odstranění falešných negativních a falešných pozitivních výsledků. Jestliže protilátka IgG konkuruje protilátce IgM na specifických vazebných místech, přítomnost protilátky IgG může vést k falešně negativnímu výsledku. Jestliže protilátka IgG vytváří imunitní komplexy s antigenovým substrátem, který může potom vázat revmatoidní faktor (třída IgM), přítomnost protilátky IgG může vést k falešnému pozitivnímu výsledku.

## Výkonové charakteristiky

### *Sensitivita a specifická*

#### **Diagnostická sensitivita**

9 HHV-6 IgM pozitivních vzorků bylo testováno pomocí Biotrin HHV-6 IgM IFA. Uvedených 9 vzorků bylo testováno s pozitivním výsledkem a vykazovaly 100 % sensitivitu.

% sensitivity = skutečně pozitivní/(skutečně pozitivní + falešně pozitivní + dvojznačné) x 100  
 $9/(9 + 0) \times 100 = 100 \%$   
 Citlivost = 100 %

#### **Diagnostická specifická**

Bylo testováno 77 normálních dárcovských vzorků séra na HHV-6IgM pomocí Biotrinu HHV-6 IgM IFA. Bylo zjištěno 76 vzorků negativních na IgM protilátky proti HHV-6 .  
 Na základě následující rovnice se zjistila 99 % specifická:

% specifická = skutečně negativní/(skutečně negativní+ falešně pozitivní + dvojznačné) x 100  
 $76/(76 + 1) \times 100 = 99 \%$   
 % specifická = 99 %

#### **Křížová reaktivita**

Bylo testováno 17 vzorků séra, aby se stanovila specifická Biotrinu HHV-6 IgM IFA. V následující tabulce jsou shrnuty výsledky vzorků séra odebraného od pacientů s těmito chorobami:

<b><u>Virus</u></b>	<b>Počet pozitivních na Biotrin HHV6 IgM IFA</b>
CMV IgM	0/2
EBV IgM	0/5
HSV IgM	0/2
VZV IgM	0/2
ANA	0/2
MCTD	0/2
Lymfický	0/2

**Tabulka 1:** Celkový počet potenciálních křížově reaktivních, které nereagovaly na protilátky IgM proti HHV6.

#### **Interference (Analytická specifická)**

Zkoumání interference zahrnovalo testy na hemolýzu, lipemii, bilirubiny a revmatoidní faktor. Bylo pozorováno cihlově červené kontrastní barvivo na všech barvených mikroskopických sklíčkách, které však neinterferovalo s interpretací intenzity fluorescence.

## Reprodukovatelnost

### Intra-test

Jeden pozitivní vzorek byl zkoušen 15krát na 2 různých šaržích. Viz Tabulku 2.

Kontrolní vzorky	Šarže 1	Šarže 2
PV	2+	2+
NV	0	0
PBS	0	0
Pozitivní vzorek	Šarže 1	Šarže 2
1	2+	2+
2	2+	2+
3	2+	2+
4	2+	2
5	1+/2+	2+
6	2+	2+
7	2+	2+
8	2+	2+
9	2+	1+/2+
10	2+	2+
11	2+	2+
12	2+	2+
13	2+	2+
14	2+	2+
15	2+	2+

**Tabulka 2:** Jeden vzorek byl testován 15krát na 2 šaržích.

### Inter-test

Na skupině vzorků bylo provedeno deset různých stanovení ze dvou různých šarží. Viz Tabulku 3.

#### Šarže 1

Vzorky	Spec	Zkouška 1	Zkouška 2	Zkouška 3	Zkouška 4	Zkouška 5	Zkouška 6	Zkouška 7	Zkouška 8	Zkouška 9	Zkouška 10
PV	2+-4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
NV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pozitivní	≥1+	2+	1+	1+/2+	1+/2+	2+	2+	2+	2+	1+/2+	2+
Pozitivní	≥1+	2+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+/2+	2+
Negativní	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativní	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Přerušení	≥1+	1+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+

#### Šarže 2

Vzorky	Spec	Zkouška 1	Zkouška 2	Zkouška 3	Zkouška 4	Zkouška 5	Zkouška 6	Zkouška 7	Zkouška 8	Zkouška 9	Zkouška 10
PV	2+-4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+/3+	2+	2+	2+	2+
NV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pozitivní	≥1+	2+	2+	2+	1+2+	1+/2+	2+	2+	2+	2+	2+
Pozitivní	≥1+	2+	1+/2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
Negativní	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativní	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Přerušení	≥1+	1+/2+	1+	2+	2+	2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	2+	1+/2+

**Tabulka 3:** Výsledky ukazují skupinu vzorků, které byly testovány na deset stanovení ze dvou různých šarží.

### Shrnutí postupu HHV- 6 IgM IFA

**Důležitá poznámka: Dříve než začnete se zkouškou, přečtěte si, prosím, celou brožurku Toto shrnutí slouží pouze k rychlému nahlédnutí.**

Kvalitativní stanovení: Zředte vzorek pacienta v IgG adsorpčním činidle v poměru 1:10  
Semikvantitativní stanovení: Začněte se zředěním vzorku v IgG adsorpčním činidle v poměru 1:20, potom přidejte stejné objemy zředěného vzorku a promývacího pufru na každé následující zředění



Přidejte 1 kapku (~20 $\mu$ l) pozitivního kontrolního vzorku do jamky čís. 1 na mikroskopickém sklíčku

Přidejte 1 kapku (~20 $\mu$ l) negativního kontrolního vzorku do jamky čís. 2 na mikroskopickém sklíčku

Přidejte 1 kapku (~20 $\mu$ l) zředěného vzorku do zbývajících jamek (jeden vzorek na jamku)



Inkubujte sklíčko při 35-39°C po dobu 3 hodin



Umyjte sklíčko promývacím pufrém



Aplikujte 1 kapku (~20 $\mu$ l) konjugátu do každé jamky



Inkubujte sklíčko při 35-39°C po dobu 30 minut



Umyjte sklíčko promývacím pufrém



Dejte 1 malou kapku (~10 $\mu$ l) montovacího média do každé jamky a přiložte mikroskopické krycí sklíčko



Prohlédněte sklíčko ve fluorescenčním mikroskopu

## Odkazy na literaturu

1. Salahuddin, S.Z., Albashi, D.V., Markham, P.D., Joseph, S.F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., Halligan, G., Biberfeld, P., Wong-Stall, F., Kramarsky, B. and Gallo, R.C. (1986) Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 234: 596-601.
2. Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y. and Kurata, T. (1988) Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum *Lancet* 1:1065-1067.
3. Asano, Y., Yoshikawa, T., Suga, S., Yazaki, T., Knodo, K. and Yamanishi, K. (1990) Fatal fulminant hepatitis in an infant with human herpesvirus-6 infection. *Lancet* 335: 862-863.
4. Asano, Y., Yoshikawa, T., Kajita, Y., Ogura, R., Suga, S., Yazaki, T., Nakashima, T., Yamada, A. and Kurata, T. (1992) Fatal encephalitis/encephalopathy in primary human herpesvirus-6 infection. *Arch, Dis Child.* 67:1484-1485.
5. Eizuru, Y., Minematsu, T., Minamishima, Y., Kikuchi, M., Yamanishi, K., Takahashi, M. and Kurata, T. (1989) Human herpesvirus-6 in lymph nodes. *Lancet* 1:40.
6. Prezioso, P.J., Cangiarella, J., Lee, M., Nuova, G.J., Borkowsky, W., Orlow, S.J. and Greca, M.A. (1992) Fatal disseminated infection with human herpesvirus-6. *J. Pediatrics* 120:921-923.
7. Dubedat, S. and Kappagoda, N. (1989) Hepatitis due to human herpesvirus-6. *Lancet* 2:1463-1464.
8. Steeper, T. A., Horwitz, C.A., Ablashi, D.V., Salahuddin, S.Z., Saxinger, C., Saltzman, R and Schwartz, B. (1990) The spectrum of clinical and laboratory findings from Human Herpesvirus-6 (HHV-6) in patients with mononucleosis-like illnesses not resulting from Epstein-Barr virus or cytomegalovirus. *Am. J. Clin. Pathol.* 93: 776-783.
9. Kruegar, G. R. F, Koch, B., Ramon, A., Ablashi, D.V., Salahuddin, S.Z., Josephs, S.F., Streicher, H.Z., Gallo, R.C. and Habermann, U. (1988) Antibody prevalence to HBLV (human herpesvirus –6, HHV-6) and suggestive pathogenicity in the general population and in patients with immune deficiency syndromes. *J. Virol. Methods* 21:125-131.
10. Buchwald, D., Cheney, P.R., Peterson, D.L., Henry, B., Wormsley, S.D., Geiger, A., Albashi, D.V., Salahuddin, S.Z., Saxinger, C., Biddle, R., Kikinis, B., Jolesz, F.A., Folks, T., Balachandran, N., Peter, J.B., Gallo, R.C. and Komaroff, A.L. (1992) A chronic illness characterized by fatigue, neurologic and immunologic disorders, and active human herpesvirus type 6 infection. *Ann. Intern. Med.* 116:103-113.
11. Soldan, S.S., Berti, R., Salem, N., Secchiero, P., Flamand, L., Calabresi, P.A., Brennan, M.B., Maloni, H.W., McFarland, H.F., Lin, H.-C., Patnaik, M. and Jacobson, S. (1997) Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: Increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nature Medicine* 3:1394-1397.
12. Yadav, M., Chandrashekan, A. Vasudevan, D.M. and Ablashi, D.V. (1994) Frequent Detection of Human Herpesvirus 6 in Oral Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 86:1792-1794.
13. Chen, M., Popescu, N., Woodworth, C., Berneman, Z., Corbellino, M., Lusso, P., Albashi, D.V. and DiPaolo, J.A. (1994) Human Herpesvirus-6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papilloma virus gene expression. *J. Virol.* 68:1173-1178.
14. Drobyski, W.R., Dunne, W.M., Burd, E.M, Knox, K.K., Ash, R.C. Horowitz, M.M., Flomberg, N. and Carrigan, D.R. (1993) Human Herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: Evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo. *J. Inf. Dis.* 167:735-739.

15. Briggs, M., Fox. J. and Tedder, R.S. (1988) Age prevalence of antibody to human herpesvirus-6. *Lancet* i:1058-1059.

### Interpretace symbolů

<i>in-vitro</i> diagnostický zdravotní prostředek	
Kód šarže	
Katalogové číslo	
Teplotní omezení	
Upotřebit do konce	
Výrobce	
Při požití škodlivý. Při styku s kyselinami uvolňuje velmi toxické plyny.	
Instrukce k použití	

### Další výrobky Biotrin

Biotrin International nabízí jedinečné portfolio testů na lidský herpes virus vhodných pro rutinní laboratorní diagnostiku.

<b>Cat # :</b>	<b>Description</b>	<b>Assay Format</b>
V3HHV6	Human Herpesvirus-6 IgG IFA	4 x 10 well slide
V17HHV6	Human Herpesvirus-6 IgM IFA	4 x 10 well slide
V15HHV6	Human Herpesvirus-6 IgG EIA	96 well EIA
V18HHV8	Human Herpesvirus-8 IgG IFA	6 x 10 well slide
V19HHV8	Human Herpesvirus-8 IgG EIA	96 well EIA

Biotrin International Ltd.  
93 The Rise, Mount Merrion  
Co. Dublin  
Ireland  
Tel: +353 (01) 2831166  
Fax: +353 (01) 2831232  
E-mail: [info@biotrin.ie](mailto:info@biotrin.ie)  
[www.biotrin.com](http://www.biotrin.com)



[www.biotrin.com](http://www.biotrin.com)