

HHV-6 IgM IFA, Kat. Nr: V17HHV6, HHV-426-03 07/09, DE



DEUTSCH

Kat. Nr: V17HHV6
Format: 4 x 10 well slides
HHV-426-03



Humanes Herpesvirus-6 IgM-Immunfluoreszenztest

Immunfluoreszenztest zum Nachweis von IgM-Antikörpern gegen das humane
Herpesvirus-6



INHALT

Verwendungszweck

Einleitung

Testprinzip

Vorsichtsmaßnahmen

Sicherheit

Allgemeines zur Testdurchführung

Bestandteile des Kits

Mitgelieferte Materialien

Zusätzlich benötigte Materialien

Lagerung und Haltbarkeit

Probenentnahme und Lagerung

Vorbereitung der Reagenzien und Proben

Testdurchführung

Interpretation der Ergebnisse

Bewertung

Qualitätskontrollkriterien

Referenzwerte

Einschränkungen des Tests

Leistungsdaten des Tests

Zusammenfassung des HHV-6 IgM-IFT

Literatur

Erläuterung der Symbole

Weitere Produkte von Biotrin

Verwendungszweck

Der Humane Herpesvirus-6 IgM-IFT von Biotrin ist zum qualitativen und semi-quantitativen Nachweis von IgM-Antikörpern gegen das humane Herpesvirus-6 (HHV-6) in Serum und Plasma vorgesehen.

Einleitung

Das humane Herpesvirus-6 (HHV-6), das erstmals 1986 beschrieben wurde, wurde aus Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen isoliert¹. Nachträglich stellte sich heraus, dass es sich bei HHV-6 um den Erreger des Dreitagefiebers (Roseola infantum)², einer Kinderkrankheit, handelt und dieses Virus mit einer Reihe weiterer Krankheitsbilder bei Kindern, u.a. akuter virusbedingter Lebernekrose³, Enzephalitis⁴, histiozytischer nekrotisierender Lymphadenitis⁵ und zum Tode führender disseminierter Infektion⁶ assoziiert ist.

Bei Erwachsenen ist eine Primärinfektion mit HHV-6 selten; dokumentierte Fälle zeigen jedoch eine Beteiligung von HHV-6 bei Hepatitis⁷, Mononukleose-ähnlichen Erkrankungen⁸, atypischer polyklonaler Lymphoproliferation⁹, post-viralem chronischem Erschöpfungssyndrom¹⁰, Multipler Sklerose¹¹, Oralkarzinom¹², Zervikalkarzinom¹³ und Knochenmarksabstoßung bei Patienten mit Knochenmarkstransplantation¹⁴.

In gezielten virologischen und serologischen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass HHV-6 in der humanen Population weit verbreitet ist und eine Infektion typischerweise in früher Kindheit erfolgt; bei Erwachsenen tritt eine Primärinfektion entsprechend selten auf. Berichten zufolge haben mehr als 80% der Patienten, die älter als 2 Jahre sind, Antikörper gegen HHV-6¹⁵. Die Prävalenz ist demnach sehr hoch, nach einer Infektion sinkt der Antikörpertiter jedoch rasch auf ein niedriges Niveau. Der Nachweis von IgM-Antikörpern gegen HHV-6 unterstützt die Diagnose einer Primärinfektion mit diesem Virus.

Testprinzip

Der Biotrin HHV-6 IFT nutzt die Methode der indirekten Immunfluoreszenz zum Antikörpernachweis und zur Titerbestimmung. Dazu werden Serum- bzw. Plasma-proben des Patienten mit HHV-6-Antigenen, die auf einem Glasobjektträger immobilisiert und stabilisiert sind, inkubiert. Enthält die Patientenprobe IgM-Antikörper gegen HHV-6, bilden diese mit dem immobilisierten Antigen stabile Komplexe aus. An gebundene Antikörper bindet dann in einem zweiten Schritt mit Fluorescein-markierter und gegen humanes IgM gerichteter Ziegenantikörper; dieser Komplex ist unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar: Bei einer positiven Reaktion zeigt sich eine leuchtend grüne Fluoreszenz.

Vorsichtsmaßnahmen

Sicherheit

- Nur zur *in vitro*-Diagnostik.
- Dieser Test darf nur von qualifiziertem Laborpersonal durchgeführt werden.
- Der Testkit enthält Material humanen Ursprungs, das als POTENZIELL BIOLOGISCH GEFÄHRLICHES MATERIAL anzusehen ist. Die Kontrollen wurden zwar auf HBsAg und Antikörper gegen HIV1/2, HTLV-I/II und HCV getestet und negativ befundet, da jedoch mit keinem Testverfahren die Anwesenheit von Infektionserregern mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden kann, müssen alle Kontrollen als potenziell infektiös gehandhabt werden.
- Einige Reagenzien enthalten Thiomersal, das beim Verschlucken Vergiftungen hervorrufen kann.
- Evans-Blau gilt als potenziell karzinogen. Jegliche Berührung vermeiden, bei Hautkontakt großzügig mit Wasser spülen.
- Einige Reagenzien enthalten Natriumazid, das mit Blei- und Kupferrohrleitungen explosive Salze bilden kann. Bei der Beseitigung flüssiger Azidabfälle sollte deshalb mit viel Wasser nachgespült werden.
- Alle klinischen Proben, infiziertes oder potenziell infiziertes Material sollten nach den Regeln der "Guten Laborpraxis" (GLP) beseitigt werden. Sie sind alle als potenziell infektiös zu handhaben und zu entsorgen.
- Reste an Chemikalien oder an Präparations- bzw. Kitbestandteilen werden grundsätzlich als gefährlicher Abfall angesehen. Alle derartigen Materialien sollten in Übereinstimmung mit den geltenden Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.
- Während der Handhabung der Proben und der Durchführung des Tests müssen Schutzkleidung, Einweg-Latexhandschuhe und Schutzbrille getragen werden. Nach der Testdurchführung gründlich die Hände waschen.
- Niemals mit dem Mund pipettieren. Essen und Trinken ist in Laborräumen nicht gestattet.

Allgemeines zur Testdurchführung

- Den Kit oder einzelne Reagenzien nicht nach Ablauf des angegebenen Verfallsdatums verwenden.
- Die aktiven Komponenten einer Charge dieses Kits sind als Einheit optimiert. Keine Komponenten mit Komponenten anderer Chargen oder anderer Quellen mischen.
- Keine kontaminierten Proben oder Reagenzien in den Test einsetzen.
- Abweichungen vom mitgelieferten Protokoll zur Testdurchführung können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Wird der Test nicht entsprechend den vorgegebenen Zeit- und Temperaturbedingungen durchgeführt, können die Ergebnisse ungültig sein. Alle Tests, die nicht den Vorgaben entsprechen, müssen wiederholt werden.
- Zur Herstellung des Waschpuffers wird destilliertes oder deionisiertes Wasser hoher Qualität benötigt. Wasser minderer Qualität oder kontaminiertes Wasser kann zu erhöhten Hintergrundwerten führen. Das Waschpufferkonzentrat muss gut durchmischt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (+20 bis +25°C) gebracht und gut gemischt werden.
-

HHV-6 IgM IFA, Kat. Nr: V17HHV6, HHV-426-03 07/09, DE

- Die Objektträger bis zum tatsächlichen Gebrauch im Schutzbeutel belassen. Lassen Sie den Beutel vor der Entnahme der Objektträger erst auf Raumtemperatur kommen, um den Inhalt vor Kondensation zu schützen.
- Reagenzien dürfen nicht für einen längeren Zeitraum direktem Sonnenlicht ausgesetzt oder bei Temperaturen über +2 bis +8°C aufbewahrt werden.
- Werden mehrere Proben auf demselben Objektträger angefärbt, müssen Kreuzkontaminationen vermieden werden. Dies lässt sich erreichen, indem die einzelnen Auftragsstellen mit einem Wachstift voneinander abgetrennt werden.
- Wird zuviel Einbettungsmedium aufgetragen, kann dies zu verschwommenen Fluoreszenzbildern führen.
- Immer saubere Glas- oder Einmalgeräte für die Reagenzienvorbereitung benutzen.
- Jegliche Kontamination muss mit äußerster Vorsicht vermieden und für jede Probe und Komponente eine frische Pipettenspitze verwendet werden.
- Die Auftragsstelle darf weder mit einer Pipettenspitze noch einer Tropfflasche zerkratzt werden.
- Vor der Testdurchführung sollte ein genauer Pipettierplan mit Schema erstellt werden.

Bestandteile des Kits

Mitgelieferte Materialien

1. Objektträger, beschichtet mit HHV-6-Antigen:

SLIDE

4 Objektträger mit je 10 Auftragsstellen (Wells), in denen mit HHV-6 infizierte humane Lymphozyten immobilisiert sind. Die Objektträger sind nach Entnahme aus dem Schutzbeutel gebrauchsfertig.

2. Positivkontrolle **:

CONTROL + IgM

1 x 0,5ml Humankontrolle mit HHV-6 IgM-Antikörpern. Enthält 0,1% Natriumazid.(Gebrauchsfertig) (Blaue Verschlusskappe)

3. Negativkontrolle **:

CONTROL - IgM

1 x 0,5ml Humankontrolle, die frei von IgM-Antikörper gegen HHV-6 ist. Enthält 0,1% Natriumazid.(Gebrauchsfertig) (Rote Verschlusskappe).

4. Fluorescein-Konjugat**:

CONJ ENZ 1X

1 x 1,5ml Fluorescein-konjugierter Ziege-anti-Mensch-IgM-Antikörper (inaktiviert); Gegenfärbung mit Evans-Blau und Rhodamin. Enthält 0,1% Natriumazid.(Gebrauchsfertig) (Gelbe Verschlusskappe).

5. Einbettungsmedium:

MM

1 x 2ml Tris-gepufferter Glycerinpuffer. Enthält Thiomersal (0,01%). (Gebrauchsfertig) (Orange Verschlusskappe).

6. Waschpuffer-Konzentrat (PBS):

BUF WASH CONC

1 Beutel. Der in Aluminiumfolie versiegelte Beutel enthält 10 PBS-Tabletten. Mit jeder Tablette können 100ml 1x Waschpuffer angesetzt werden.

7. Saugpapier für Objektträger:

BLT

4 Saugpapiere zum Trocknen der Objektträger, in die Löcher für die Wells vorgestanzt sind.

8. Arbeitsanleitung:



**** Potentiell biogefährliches Material.**

Zusätzlich benötigte Materialien

- Technische Ausstattung zur Serumgewinnung.
- Gestell für die Objektträger und Färbeschale zum Waschen der Objektträger.
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser hoher Qualität.
- Saubere maßanalytische Laborartikel.
- Probenröhrchen oder Vergleichbares zur Probenvorbereitung.
- Messzylinder.
- Pipetten, Mikropipetten und Einmalspitzen zum exakten Pipettieren folgender Volumina: 5µl bis 50µl und 50µl bis 200µl.
- Stoppuhr.
- Brutschrank, +35 bis +39°C.
- Papiertücher oder saugfähiges Papier.
- Probenröhrchen für die Verdünnungsansätze und Zentrifugenröhrchen (0,5ml).
- Tischzentrifuge (Minifuge).
- Feuchte Kammer für die Inkubation der Objektträger.
- Waschflaschen und Waschtrog.
- Deckgläschen: 22 X 50mm, Glasdicke Nr.1.
- Wachsstift.
- IgG-Adsorptionslösung (kommerziell erhältlich).
- Fluoreszenzmikroskop mit einer FITC-geeigneten Filterkombination (Anregungswellenlänge 495nm, Emissionswellenlänge 515nm); empfohlen wird außerdem eine Halogen-Lichtquelle. Die Fluorescein-Markierung hat ihre Maxima bei der Anregungswellenlänge von 490nm und der Emissionswellenlänge von 520nm. Unterschiede in den Endpunkt-Reaktivitäten und Fluoreszenzintensitäten sind in der Regel auf Typ und Zustand des im Labor verwendeten Fluoreszenzgeräts zurückzuführen.

Lagerung und Haltbarkeit

- Der Kit ist bei Lagerung zwischen +2 bis +8°C bis zu dem auf dem äußeren Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Hinweis: Das Saugpapier kann bei +2 bis +25°C gelagert werden.
- Alle für die Testdurchführung nicht verbrauchten Komponenten sollten direkt nach Entnahme der benötigten Mengen wieder bei +2 bis +8°C gelagert werden.
- Der rekonstituierte Waschpuffer ist bei Lagerung zwischen +2 bis +8°C bis zu 4 Wochen haltbar.

Probenentnahme und Lagerung

- Die Proben sollten mit aseptischen Labormethoden gewonnen werden. Sie können bei +2 bis +8°C bis zu 1 Woche bzw. für einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.
- Stark lipämische Proben dürfen nur nach Entfettung in den Test eingesetzt werden.
- Es dürfen keine kontaminierten Proben getestet werden.

Vorbereitung der Reagenzien und Proben***Vorbereitung der Reagenzien***

Zur Herstellung des Waschpuffers 1 Tablette PBS in 100ml frisch zubereitetes destilliertes oder deionisiertes Wasser geben und durch Schütteln lösen. Diese Lösung kann in einem sauberen und verschlossenen Behälter bis zu 4 Wochen bei +2 bis +8°C gelagert werden.

Alle übrigen Reagenzien werden gebrauchsfertig und in Arbeitsverdünnung geliefert.

Vorbereitung der Proben

Qualitativer Test: Zuerst wird aus allen Proben das IgG entfernt. Dazu zu 10µl der zu testenden Probe 90µl Adsorptionslösung zugeben und gut mischen. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren und dann das adsorbierte IgG 2 Minuten bei 10.000rpm und Raumtemperatur abzentrifugieren. Der Überstand wird zum HHV-6-Test auf die entsprechende Auftragsstelle auf dem Objektträger gegeben.

Semi-Quantitativer Test: Der Proben“titer” kann durch eine zweifache serielle Verdünnung der Probe in Waschpuffer ermittelt werden, indem man ausgehend von der 1:20-Verdünnung für die weiteren Verdünnungen gleiche Volumina an verdünnter Probe und Waschpuffer verwendet, bis eine “+1” Zuordnung der Fluoreszenz erreicht ist (siehe "Interpretation der Ergebnisse").

Testdurchführung

Alle Komponenten sollten vor Durchführung des Tests Raumtemperatur (+20 bis +25°C) erreicht haben.

1. Vorbereitung der Objektträger

Benötigte Anzahl an Objektträgern aus ihrem Beutel entnehmen und zur Vermeidung von Kontaminationen mit einem Wachsstift Trennlinien zwischen den einzelnen Wells (Auftragsfeldern) ziehen. Pro nummerierter Auftragsstelle entweder jeweils 1 Tropfen (ca.20µl) der verdünnten Probe oder 1 Tropfen (ca.20µl) gebrauchsfertige Positivkontrolle bzw. Negativkontrolle auftragen.

Hinweis: Das Auftragsvolumen sollte hinreichend groß sein, um das Well komplett abzudecken, darf jedoch nicht so groß sein, dass sich die Inhalte der verschiedenen Wells miteinander vermischen können.

2. Inkubation der Proben

Die Objektträger in einer feuchten Kammer 3 Stunden bei +35 bis +39°C inkubieren.

3. Waschen der Objektträger

Die Objektträger vorsichtig mit Waschpuffer vom Rand her mit einer Waschflasche abspülen. Den Pufferstrahl nicht direkt auf die Auftragsstellen richten. Objektträger in einem Waschtrog mit Waschpuffer 10 Minuten bei Raumtemperatur (+20 bis +25°C) waschen, Puffer nach 5 Minuten wechseln. Objektträger rund um die Auftragsstellen mit dem mitgelieferten Saugpapier trocknen.

4. Inkubation mit dem Konjugat

In jedes Well 1 Tropfen (ca. 20µl) des gebrauchsfertigen Konjugats geben. Objektträger in einer feuchten Kammer 30 Minuten bei +35 bis +39°C inkubieren.

5. Waschen der Objektträger

Schritt 3 wiederholen.

6. Auftragen des Einbettungsmediums

In die Mitte jeden Wells 1 kleinen Tropfen Einbettungsmedium geben und vorsichtig ein Deckgläschen auflegen.

7. Auswertung der Objektträger

Reaktivität unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Vergrößerung von 200-500X beobachten. Für optimale Ergebnisse Objektträger direkt nach Abschluss des Tests auswerten. (Zur Erzielung reproduzierbarer Ergebnisse Objektträger zur Minimierung einer Dehydrierung des Einbettungsmediums versiegeln oder feucht halten, bei +2 bis +8°C dunkel aufbewahren und innerhalb von drei Tagen auswerten.)

8. Bewertung der Farbintensität

Bei positivem Ergebnis kann sich die Intensität der Fluoreszenz in einem Bereich von kräftig bis schwach leuchtend bewegen. Abstufung der Reaktion gemäß folgender Intensitätsskala: +4 (kräftig leuchtend), +3 (leuchtend), +2 (mäßig), +1 (schwach).

Interpretation der Ergebnisse

Negative Reaktion:

Eine Probe gilt als negativ, enthält also keine IgM-Antikörper gegen HHV-6, wenn sich keine Fluoreszenzfärbung der infizierten Zellen zeigt.

Positive Reaktion:

Eine Probe gilt nur dann als HHV-6-positiv, wenn sich in den infizierten Zellen bei einer Verdünnung von $\geq 1:20$ eine leuchtend grüne Fluoreszenz zeigt. Eine positive Reaktion weist auf eine HHV-6-Primärinfektion hin.

+4 = Kräftig leuchtende, grüne Fluoreszenz, die einen sehr hohen HHV-6 IgM-Antikörpertiter anzeigt.

+3 = Leuchtend grüne Fluoreszenz, die einen hohen HHV-6 IgM-Antikörpertiter anzeigt.

+2 = Grüne Fluoreszenz, die auf einen mäßigen HHV-6 IgM-Antikörpertiter hinweist.

+1 = Schwache grüne Fluoreszenz, die auf einen schwachen HHV-6 IgM-Antikörpertiter hinweist. Sie zeigt die Endpunktverdünnung bzw. den "Titer" der Probe an.

- Die Titration der HHV-6-positiven IgM-Proben liefert quantitative Daten. In einer Titrationsserie wird die höchste Serumverdünnung, die eine "+1"-Reaktivität zeigt, als Endpunkt definiert.
- Zur internen Kontrolle enthält jedes Well auf dem Objektträger neben den HHV-6-infizierten Zellen auch nicht-infizierte Zellen; diese Bestückung ist Voraussetzung für eine ordnungsgemäße Auswertung. Die nicht-infizierten Zellen werden zur Erzeugung eines kontrastreichen Hintergrunds rot gegengefärbt.
- Das Muster der Fluoreszenzfärbung HHV-6-infizierter Zellen ist variabel. Abhängig vom Infektionsstadium der Zellen können nur kleine Bereiche der infizierten Zelle oder aber die gesamte Zelle fluoreszieren, weiterhin kann die Fluoreszenz körnig oder homogen erscheinen.

Bewertung

Keine erkennbare Fluoreszenz der infizierten Zellen in der untersuchten Verdünnung.	Probe ist negativ; sie enthält keine IgM-Antikörper gegen HHV-6.
Spezifische positive Fluoreszenz der infizierten Zellen bei der Ausgangsverdünnung oder einer höheren Verdünnung.	Probe ist positiv. Die Anwesenheit von HHV-6 IgM-Antikörpern weist auf eine akute Infektion hin.
Fluoreszenz in den infizierten als auch nicht-infizierten Zellen.	Probe zeigt eine unspezifische Reaktion.

Qualitätskontrollkriterien

Bei jedem Test müssen Positivkontrolle und Negativkontrolle mitgeführt werden. Die Ergebnisse eines Tests werden nur dann als gültig betrachtet, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- 1) Die in diesem Kit enthaltene HHV-6 IgM-Positivkontrolle zeigt in der infizierten Zelle eine Fluoreszenzintensität von $\geq +2$.
- 2) Die in diesem Kit enthaltene HHV-6 IgM-Negativkontrolle zeigt keine spezifische Fluoreszenz der untersuchten Zellen.

Werden diese oben genannten Kriterien nicht erfüllt, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

Referenzwerte

Die HHV-6 Antikörper-Prävalenz liegt bei Patienten, die älter als 2 Jahre sind, über 80%. Die Durchseuchungsrate ist zwar hoch, der HHV-6-Antikörpertiter sinkt allerdings nach der Infektion auf ein niedriges Niveau. Eine hohe Konzentration an IgM-Antikörpern weist demnach auf eine Primärinfektion hin.

Einschränkungen des Tests

- Serologische Tests wie der IFT dienen beim Nachweis von viralen Infektionen als Hilfe, sollten aber nicht als alleiniges Diagnosekriterium eingesetzt werden. Die Testergebnisse sollten immer mit dem klinischen und epidemiologischen Profil sowie anderen klinischen Laborergebnissen der Patienten verglichen werden.
- Bei Patienten mit bestimmten Autoimmunerkrankungen können aufgrund antinukleärer und/oder anticytoplasmatischer Antikörper unspezifische positive Reaktionen auftreten. In diesem Fall werden sowohl die infizierten als auch die uninfizierten Zellen fluoreszieren und eine positive Reaktion vortäuschen. Die Beobachtung einer Autoimmunreaktion schließt allerdings eine HHV-6-Infektion nicht aus.
- Eine in einer frühen Phase der Infektion entnommene Probe enthält eventuell noch keine für einen Nachweis ausreichenden Mengen an IgM-Antikörper. Besteht Verdacht auf eine Virusinfektion, sollte 7-14 Tage später eine zweite Probe entnommen und parallel zur ersten untersucht werden, um eine Seroconversion bzw. einen deutlichen Anstieg im Titer spezifischer IgM- und IgG-Antikörper nachweisen zu können; beides ist für eine Primärinfektion indikativ.
- Bei der Untersuchung von Nabelschnurblut ist zu beachten, dass es mit mütterlichen IgM-Antikörpern kontaminiert sein kann. Werden also spezifische IgM-Antikörper nachgewiesen, ist es ratsam, das positive Ergebnis durch Testung einer zweiten Probe, die vorzugsweise innerhalb der ersten 5 Lebensstage des Säuglings entnommen wird, zu bestätigen.
- Spezifische IgM-Antikörper sind in der Regel bei Patienten mit einer erst kürzlich durchgemachten Primärinfektion nachweisbar. IgM-Antikörper finden sich bei Patienten mit reaktivierten bzw. Sekundärinfektionen.
- Biotrin empfiehlt eine Vorbehandlung der zu testenden Proben zur Entfernung von IgG-Antikörpern. Dieser zusätzliche Schritt sorgt dafür, falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse auszuschalten. Konkurrieren nämlich IgG-Antikörper mit IgM-Antikörpern um spezifische Bindungsstellen, kann die Bindung von IgG-Antikörpern zu falsch-negativen Testergebnissen führen. Bilden IgG-Antikörper Immunkomplexe mit dem Antigen, könnten diese Rheumafaktor (IgM-Klasse) binden und so falsch-positive Ergebnisse bedingen.

Leistungsdaten des Tests

Sensitivität und Spezifität

Diagnostische Sensitivität

9 HHV-6-IgM-positive Proben wurden mit dem Biotrin HHV-6 IgM-IFT getestet und alle 9 positiv befundet, d.h. die Sensitivität des Biotrin-Tests beträgt 100%.

$$\% \text{ Sensitivität} = \frac{\text{eindeutig positive Proben}}{\text{positive} + \text{falsch negativ} + \text{fragwürdig}} \times 100$$

$$\% \text{ Sensitivität} = \frac{9}{(9+0)} \times 100$$

$$\% \text{ Sensitivität} = 100\%$$

Diagnostische Spezifität

77 Serumproben gesunder Spender wurden mit dem Biotrin HHV-6 IgM-IFT getestet und 76 dieser Proben negativ befundet, d.h. die Spezifität des Biotrin-Tests beträgt nach folgender Gleichung 99%:

$$\% \text{ Spezifität} = \frac{\text{eindeutig negative Proben}}{\text{falsch positive} + \text{negative} + \text{fragwürdig}} \times 100$$

$$\% \text{ Spezifität} = \frac{76}{(76 + 1)} \times 100$$

$$\% \text{ Spezifität} = 99\%$$

Kreuzreaktivität

Zur Ermittlung der Spezifität des Biotrin HHV-6 IgM-IFTs wurden 17 Serumproben, die von Patienten mit unterschiedlichen Krankheiten stammten, gescreent. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen:

Virus	Anzahl an positiven Befunden mit dem Biotrin HHV-6 IgM-IFT
CMV-IgM	0/2
EBV-IgM	0/5
HSV-IgM	0/2
VZV-IgM	0/2
ANA	0/2
MCTD	0/2
Lyme	0/2

Tabelle 1: Viren, die den Test potentiell beeinflussen könnten, aber nicht mit den HHV-6-IgM-Antikörper reagieren.

Interferenzen (Analytische Spezifität)

Im Rahmen der Interferenzstudien wurden die Proben u.a. auf Hämolyse, Lipide, Bilirubin und Rheumafaktoren getestet.

Bei allen gefärbten Objektträgern zeigte sich eine ziegelrote Gegenfärbung; es fand keine Beeinträchtigung in der Interpretation der Fluoreszenzintensität statt.

Reproduzierbarkeit

Intra-Assay

Eine positive Probe wurde innerhalb des gleichen Testlaufs 15 Male mit zwei verschiedenen Chargen des Testkits getestet. Siehe Tabelle 2.

Kontrollen	Charge 1	Charge 2
PK	2+	2+
NK	0	0
PBS	0	0
Positive Probe	Charge 1	Charge 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+

Tabelle 2: Eine Probe wurde mit zwei Kitchargen 15 Male parallel getestet.

Inter-Assay

Eine Reihe von Proben wurde in zehn voneinander unabhängigen Testläufen mit zwei unterschiedlichen Kitchargen getestet. Siehe Tabelle 3.

Charge 1

Proben	Spez	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Test 7	Test 8	Test 9	Test 10
PK	2+-4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Positiv	≥1+	2+	1+	1+/2+	1+/2+	2+	2+	2+	2+	1+/2+	2+
Positiv	≥1+	2+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+/2+	2+
Negativ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cut-off	≥1+	1+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+

Charge 2

Proben	Spez	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Test 7	Test 8	Test 9	Test 10
PK	2+-4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+/3+	2+	2+	2+	2+
NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Positiv	≥1+	2+	2+	2+	1+2+	1+/2+	2+	2+	2+	2+	2+
Positiv	≥1+	2+	1+/2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
Negativ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cut-off	≥1+	1+/2+	1+	2+	2+	2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	2+	1+/2+

Tabelle 3: Aufgelistet sind die Testergebnisse mehrerer Proben, die in zehn voneinander unabhängigen Testläufen mit zwei verschiedenen Chargen des Kits getestet wurden.

Zusammenfassung des HHV-6 IgM IFT

Wichtiger Hinweis: Bitte vor Beginn des Tests die gesamte Produktbeschreibung einschließlich der Anleitung zur Testdurchführung durchlesen!

Diese Zusammenfassung dient ausschließlich dem Überblick.

Qualitative Bestimmung: Patientenprobe 1:10 in IgG-Adsorptionslösung verdünnen

Semi-Quantitative Bestimmung: Mit einer 1:20-Verdünnung der Probe in IgG-Adsorptionslösung beginnen und dann diese verdünnte Probe seriell 1+1 mit Waschpuffer weiterverdünnen



1 Tropfen (~20µl) Positivkontrolle in Well Nr. 1 des Objektträgers geben
1 Tropfen (~20µl) Negativkontrolle in Well Nr. 2 des Objektträgers geben
1 Tropfen (~20µl) verdünnte Probe in alle übrigen Wells geben (eine Probe pro Well)



Objektträger 3 Stunden bei +35 bis +39°C inkubieren



Objektträger mit Waschpuffer waschen



1 Tropfen (~20µl) Konjugat in jedes Well hinzufügen



Objektträger 30 Minuten bei +35 bis +39°C inkubieren



Objektträger mit Waschpuffer waschen



1 kleinen Tropfen (~10µl) Einbettungsmedium in jedes Well geben und Deckgläschen auflegen



Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop auswerten

Literatur

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., Chandrashekran, 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.

Erläuterung der Symbole

In-vitro Diagnostikum

IVD

Charge

LOT

Katalog-Nr.

REF

Temperaturbegrenzung



Verwendbar bis



Hersteller



Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
Bei Kontakt mit Säuren werden sehr giftige Gase freigesetzt.



Arbeitsanleitung



Weitere Produkte von Biotrin

Biotrin bietet ein einmaliges, für Routinediagnosen im Labor geeignetes Sortiment an Testkits für Humane Herpesviren an:

Cat #:	Description	Assay Format
V17HHV6	Human Herpesvirus-6 IgM IFA	4 x 10 well slides
V3HHV6	Human Herpesvirus-6 IgG IFA	4 x 10 well slides
V15HHV6	Human Herpesvirus-6 IgG EIA	96 well EIA
V18HHV8	Human Herpesvirus-8 IgG IFA	6 x 10 well slides
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
www.biotrin.com



Zusätzliche Informatzionen zu diesem oder anderen Biotrin-Produkten finden Sie auf unserer Website

www.biotrin.com