

ITALIANO

Catalogo nr.: V17HHV6
Confezione: 4 x 10 well slide
HHV-426-03



**Herpes Virus umano, tipo-6
IgM IFA**

Test in immunofluorescenza per la rilevazione di anticorpi IgM anti-Herpesvirus umano tipo-6



Indice

Uso previsto

Introduzione

Principio del test

Precauzioni

Sicurezza

Procedura

Contenuto del kit

Materiale fornito

Materiale addizionale non contenuto nel kit

Conservazione e stabilità

Raccolta e conservazione dei campioni

Preparazione di reagenti e campioni

Procedura del test

Interpretazione dei risultati

Interpretazione dei dati

Criteri per controllo di qualità

Valori attesi

Limiti di utilizzo

Performance del test

Sintesi della procedura di HHV-6 IgM IFA

Riferimenti

Interpretazione dei simboli

Altri prodotti Biotrin disponibili

Uso previsto

Biotrin Herpesvirus umano tipo-6 IgM IFA è un test di immunofluorescenza per la rilevazione qualitativa e semiquantitativa degli anticorpi IgM anti-Herpesvirus umano tipo-6 (HHV-6) nel siero e nel plasma.

Introduzione

L'Herpesvirus umano tipo-6 (HHV-6), descritto per la prima volta nel 1986, è stato isolato da pazienti con disturbi linfoproliferativi¹. Successivamente, HHV-6 è stato confermato essere l'agente eziologico responsabile della malattia infantile *Esantema Subitum* (Roseola infantum)² ed è stato associato ad un certo numero di altre malattie infantili, comprese epatite fulminante³, encefalite⁴, linfadenite istiocitica necrotizzante⁵ e *setticemia mortale*⁶.

Negli adulti, l'infezione primaria con HHV-6 è meno comune, ma è dimostrato che HHV-6 può essere presente in casi di epatite⁷, malattia mononucleosi-simile⁸, linfoproliferazione policlonale atipica⁹, "sindrome post-virale di affaticamento cronico"¹⁰, sclerosi multipla¹¹, carcinoma orale¹², carcinoma cervicale¹³ e *aplasia midollare in pazienti da sottoporre a trapianto*¹⁴.

I test virologici e sierologici specifici hanno stabilito che HHV-6 è presente in maniera ubiquitaria nella popolazione umana, con l'insorgenza dell'infezione generalmente durante la prima infanzia e la possibilità di presentarsi in alcuni adulti ancora come infezione primaria. La prevalenza dell'anticorpo è riportata come superiore all'80% nei pazienti con più di 2 anni di età¹⁵. Tuttavia, anche se la prevalenza dell'anticorpo HHV-6 è alta, il livello dell'anticorpo si riduce a titoli bassi in seguito all'infezione. La rilevazione di anticorpi IgM anti-HHV-6 nell'uomo può essere utilizzata come supporto nella diagnosi di infezione primaria di questo virus.

Principio del test

Biotrin HHV-6 IFA utilizza il metodo di immunofluorescenza indiretta per la rilevazione degli anticorpi e la determinazione del titolo. I campioni di siero o di plasma vengono incubati con antigene HHV-6 immobilizzato, che è stato stabilizzato su un vetrino. Se sono presenti anticorpi IgM anti-HHV-6 nel campione si forma un complesso stabile con l'antigene. L'anticorpo legato viene fatto quindi reagire con IgM di capra anti-umane coniugate con fluoresceina e questo complesso viene visualizzato con l'aiuto di un microscopio a fluorescenza. Si denota quindi una reazione anticorpale positiva contrassegnata da una fluorescenza verde brillante.

Precauzioni

Sicurezza

- Per esclusivo uso diagnostico *in vitro*.
- Il kit è inteso ad uso esclusivo di Personale di laboratorio qualificato.
- Questo kit contiene materiale di origine umana, da considerarsi **POTENZIALMENTE INFETTO**. I controlli sono stati testati e trovati negativi ai test HBsAg, ed agli anticorpi anti-HIV 1 / 2, HTLV-I/II ed HCV. Tuttavia, poiché nessun metodo di analisi può garantire la totale sicurezza di assenza del virus, si raccomanda trattare i controlli come potenzialmente infetti.
- Alcuni reagenti contengono Thiomersal, che può essere tossico se ingerito.

HHV-6 IgM IFA, Catalogo nr: V17HHV6, HHV-426-03 07/09, IT

- Evitare il contatto con Evans Blue poiché potenzialmente cancerogeno. In caso di contatto accidentale con la pelle sciacquare abbondantemente con acqua.
- Alcuni reagenti contengono sodio azide, che può formare azidi metalliche potenzialmente esplosive se messa a contatto con tubature di piombo e rame. Per lo smaltimento, i reagenti devono essere fatti defluire con grandi volumi di acqua per mantenere bassa la concentrazione di azide.
- Lo smaltimento di tutti i campioni clinici e del materiale infetto o potenzialmente infetto deve avvenire nel totale rispetto delle procedure di laboratorio. Tutti i materiali dovranno essere trattati e smaltiti come potenzialmente infetti.
- I residui dei prodotti chimici, dei preparati e del contenuto del kit sono considerati generalmente come rifiuti pericolosi. Tutti i materiali dovrebbero quindi essere smaltiti in conformità con le procedure di sicurezza previste.
- Indossare vestiario di protezione, guanti di lattice monouso e protezione oculare durante la manipolazione dei campioni e l'esecuzione del test. Lavare attentamente le mani al termine.
- Non pipettare i materiali con la bocca ed evitare assolutamente di mangiare o bere sul banco di lavoro del laboratorio.

Procedura

- Non utilizzare il kit o i singoli reagenti oltre la data di scadenza.
- Non mischiare o sostituire reagenti provenienti da kit di lotti differenti.
- Non utilizzare campioni o reagenti contaminati.
- Lo scostamento dal protocollo fornito può causare risultati errati.
- I test eseguiti con tempi e temperature differenti da quelli stabiliti possono produrre risultati non validi. I test non conformi a tempi e temperature riportati in metodica devono essere ripetuti.
- Per la diluizione del tampone di lavaggio concentrato utilizzare solo acqua distillata o deionizzata di alta qualità. L'impiego di acqua di bassa qualità o contaminata può provocare disturbo di fondo. Accertarsi che il tampone di lavaggio sia accuratamente mescolato.
- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) e mescolare bene prima di iniziare il test.
- Non rimuovere i vetrini dal relativo sacchetto protettivo fino al momento dell'utilizzo. Portare i vetrini a temperatura ambiente prima di aprire il sacchetto protettivo per prevenire il contenuto dalla formazione di condensa.
- Evitare di lasciare i reagenti alla luce solare diretta e/o ad una temperatura superiore a 2-8°C per periodi prolungati.
- Durante la colorazione di campioni multipli su un vetrino evitare la cross contaminazione tra campioni delimitando i contorni dei pozzetti con ceralacca.
- L'impiego di una eccessiva quantità di mezzo di montaggio può causare una fluorescenza poco chiara.
- Utilizzare sempre vetreria pulita e preferibilmente monouso per la preparazione di tutti i reagenti.
- Prestare la massima attenzione a non contaminare i componenti del kit ed utilizzare sempre puntali per pipette nuovi per ciascun campione e ciascun reagente.
- Non graffiare il pozzetto con il puntale della pipetta o il contagocce.
- Prima di iniziare il test pianificare l'identificazione e la distribuzione dei campioni.

Contenuto del kit**Materiale fornito**

1. Vetrini con antigene HHV-6:

SLIDES

4 x 10 vetrini su cui sono stati fissati linfociti umani infettati con HHV-6. I vetrini sono pronti all'uso dopo la rimozione del sacchetto protettivo.

2. Controllo positivo **:

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

1 x 0.5ml controllo positivo umano di anticorpi IgM anti-HHV-6. Contiene 0.1% sodio azide. (Pronto all'uso) (tappo blu).

3. Controllo negativo **:

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

1 x 0.5ml controllo negativo umano di anticorpi IgM anti-HHV-6. Contiene 0.1% sodio azide. (Pronto all'uso) (tappo rosso).

4. Coniugato fluoresceina**:

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

1 x 1.5ml IgM di capra anti-umane (inattivate) coniugate con fluoresceina con coloranti di contrasto Evans Blue e Rodamina. Contiene 0.1% sodio azide. (Pronto all'uso) (tappo giallo).

5. Mezzo di montaggio:

MM

1 x 2ml glicerolo in tampone Tris. Contiene Thiomersal (0.01%). (Pronto all'uso) (Tappo arancio).

6. Tampone di lavaggio concentrato (PBS):

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

1 sacchetto. Il pacchetto di alluminio sigillato contiene 10 pastiglie di PBS. Ogni pastiglia serve per 100ml di tampone di lavaggio 1x.

7. Tamponi di carta assorbente per vetrini (BLT):

BLT

4 tamponi di carta assorbente con fori prestampati adatti all'essiccazione della maschera dei vetrini.

8. Istruzioni per l'uso:



**** materiale potenzialmente infettivo**

Materiale addizionale non contenuto nel kit

- Attrezzatura per la raccolta del campione.
- Cestello portavetrini e vaschetta di colorazione per il lavaggio dei vetrini.
- Acqua distillata o deionizzata di alta qualità.
- Vetreria da laboratorio pulita.
- Provette o materiale equivalente per la preparazione del campione.
- Cilindri graduati.
- Pipette di precisione, micropipette e puntali monouso per la dispensazione di volumi di 5-50 μ l e 50-200 μ l.
- Contaminuti.
- Incubatore 35-39°C.
- Tovaglioli di carta o carta assorbente.
- Provette di diluizione e provette per minicentrifuga (0.5ml).
- Minicentrifuga da tavolo.
- Vassoio di incubazione contenente carta velina umida.
- Bottiglie e vaschetta di lavaggio.
- Vetrini coprioggetto: 22 x 50mm spessore nr. 1.
- Ceralacca.
- Adsorbente IgG (disponibile in commercio).
- Microscopio a fluorescenza con appropriata combinazione di filtri per FITC (filtro di eccitazione a 495nm, filtro di emissione a 515nm), si raccomanda l'utilizzo di una lampada alogena come sorgente luminosa. La fuoresceina marcante ha un picco di eccitazione a 490nm e un picco di emissione a 520nm. Le differenze nelle reazioni endpoint e nelle intensità di fluorescenza possono essere dovute al tipo ed alle condizioni dell'apparecchiatura utilizzata nel laboratorio.

Conservazione e stabilità

- Il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna della scatola se conservato a 2-8°C. Nota: i tamponi di carta assorbente possono essere conservati a 2-25°C.
- Tutti i componenti del kit non utilizzati devono essere nuovamente immagazzinati a 2-8°C subito dopo l'uso.
- La soluzione di lavaggio ricostituita è stabile fino a 4 settimane se conservata a 2-8°C.

Raccolta e conservazione dei campioni

- Per il prelievo dei campioni utilizzare tecniche di laboratorio aseptiche. I campioni possono essere conservati fino ad 1 settimana a 2-8°C e a -20°C per periodi più lunghi. Evitare ripetuti congelamenti / scongelamenti.
- Non utilizzare campioni fortemente lipemici senza averli preventivamente trattati per eliminare l'eccesso lipemico.
- Non utilizzare campioni contaminati.

Preparazione di reagenti e campioni**Preparazione dei reagenti**

Preparare il tampone di lavaggio aggiungendo una pastiglia di PBS a 100ml di acqua distillata o deionizzata preparata di fresco. Mescolare bene per una completa dissoluzione. Conservare in un contenitore pulito e chiuso a 2-8°C fino a 4 settimane.

I restanti componenti del kit vengono forniti pronti all'uso ed alla diluizione di lavoro.

Preparazione dei campioni

Test qualitativo: Tutti i campioni sono pretrattati per rimuovere le IgG. Aggiungere 90 µl di adsorbente a 10µl di campione e mescolare bene. Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Centrifugare a 10.000 rpm per 2 minuti a temperatura ambiente. Dispensare quindi il sovrantante sul vetrino.

Test semi-quantitativo: Il "titolo" del campione può essere determinato preparando una duplice diluizione seriale del campione in tampone di lavaggio, iniziando con una diluizione 1:20 del campione nell'adsorbente e aggiungendo uguali volumi di campione diluito e tampone di lavaggio ad ogni diluizione consecutiva, fino al raggiungimento di un grado di fluorescenza pari a "+1" (v. "Interpretazione dei risultati").

Procedura del test

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso.

1. Preparazione dei vetrini

Prelevare il numero di vetrini necessario dal sacchetto protettivo e delimitare i contorni dei pozzetti con ceralacca per evitare contaminazioni. Dispensare 1 goccia (ca. 20µl) di ogni campione diluito e 1 goccia (ca. 20µl) di controllo positivo e negativo, pronti all'uso, nei pozzetti numerati.

Nota: aggiungere un volume sufficiente a coprire ogni pozzetto, ma evitare di mischiare i contenuti dei pozzetti.

2. Incubazione dei campioni

Incubare il vetrino in camera umida per 3 ore a 35-39°C.

3. Lavaggio dei vetrini

Sciacquare i vetrini lungo il bordo facendo defluire un leggero flusso di tampone di lavaggio dalla bottiglia di lavaggio. Non indirizzare il deflusso direttamente sui pozzetti. Collocare i vetrini su una vaschetta di lavaggio contenente tampone di lavaggio per 10 minuti a temperatura ambiente (20-25°C) cambiando il tampone di lavaggio dopo 5 minuti. Asciugare la mascherina tracciata che circonda i pozzetti con i tamponi di carta assorbente forniti nel kit.

4. Incubazione con coniugato

Mettere 1 goccia (ca. 20µl) di coniugato pronto all'uso in ogni pozzetto. Incubare i vetrini in una camera umida per 30 minuti a 35-39°C.

5. Lavaggio dei vetrini

HHV-6 IgM IFA, Catalogo nr: V17HHV6, HHV-426-03 07/09, IT
Ripetere il passaggio 3.

6. Applicazione del mezzo di montaggio
Versare 1 goccia scarsa di mezzo di montaggio nel mezzo di ogni pozzetto coprire con un vetrino coprioggetto.
7. Lettura dei vetrini
Leggere sotto un microscopio a fluorescenza utilizzando un ingrandimento 200-500x. Per risultati migliori, leggere i vetrini immediatamente al termine del test. (Per ottenere risultati equivalenti, sigillare i vetrini o mantenerli umidi per ridurre al minimo l'essiccazione del mezzo di montaggio. Conservare al buio a 2- 8°C. Leggere entro 3 giorni.)
8. Classificazione
Una reattività positiva può variare di intensità in fluorescenza da brillante a debole. Classificare la reazione in fluorescenza secondo la seguente scala di intensità: +4 (brillante), +3 (vivace), +2 (moderata), +1 (debole).

Interpretazione dei risultati

Reazione negativa:

Un campione viene considerato negativo al test per anticorpi IgM anti-HHV-6 in assenza di fluorescenza nelle cellule infette.

Reazione positiva:

Si denota una reazione positiva dell'anticorpo HHV-6 solo in presenza di una fluorescenza verde brillante nelle cellule infette ad una diluizione $\geq 1:20$. Una reazione positiva indica una infezione primaria di HHV-6.

+4=Fluorescenza verde brillante indicativa di un altissimo titolo di anticorpi IgM anti-HHV-6.

+3=Fluorescenza verde brillante indicativa di un alto titolo di anticorpi IgM anti-HHV-6.

+2=Fluorescenza verde indicativa di un titolo medio di anticorpi IgM anti-HHV-6.

+1=Fluorescenza verde pallido indicativa di un debole titolo di anticorpi IgM anti-HHV-6. Ciò è anche indicativo della diluizione o "titolo" del campione.

- La titolazione dei campioni positivi ad IgM anti-HHV-6 fornisce informazioni quantitative. In una serie di titolazioni la più alta diluizione del siero che mostra una reazione "+1" viene interpretata come titolo.
- Per ottenere un controllo interno, ogni pozzetto sul vetrino del microscopio contiene sia cellule infettate con HHV-6 che non infettate. La preparazione del vetrino in questo modo è intenzionale. Le cellule non infettate, colorate in rosso dalla contro-colorazione, determinano un background contrastante.
- Il pattern di colorazione fluorescente delle cellule infettate da HHV-6 è variabile. A seconda della fase di infezione delle cellule, il pattern di fluorescenza può variare da una piccola porzione di cellula infettata fluorescente alla fluorescenza dell'intera cellula. La fluorescenza può anche variare da granulare a omogenea.

Interpretazione dei dati

Non è stata riscontrata alcuna fluorescenza visibile di cellule infette alla diluizione di screening.	Il campione testato è negativo all'anticorpo IgM anti-HHV-6.
E' stata riscontrata una fluorescenza positiva specifica delle cellule infettate alla diluizione di screening o a diluizioni più elevate.	Il campione testato è positivo all'anticorpo IgM anti-HHV-6 e indica un'infezione in corso.
Viene riscontrata una fluorescenza sia nelle cellule infette che in quelle non infette	Il campione mostra una reazione non specifica.

Criteria per controllo di qualità

Ogni test deve contenere il controllo positivo e quello negativo. I risultati di un test sono considerati validi se rispondono ai seguenti criteri:

- 1) Il controllo positivo IgM anti-HHV-6 fornito nel kit produce una fluorescenza di intensità $\geq +2$ della cellula infettata
- 2) Il controllo negativo IgM anti-HHV-6 fornito nel kit produce una fluorescenza non specifica delle cellule infette.

Se i suddetti criteri vengono disattesi, il test è considerato non valido e deve essere ripetuto.

Valori attesi

La prevalenza dell'anticorpo anti-HHV-6 è riportata come superiore all'80% nei pazienti con più di 2 anni di età. Sebbene la prevalenza dell'anticorpo sia elevata, il titolo anticorpale HHV-6 si riduce a livelli bassi in epoca successiva all'infezione. Quindi, livelli elevati di IgM possono essere indicativi di una recente infezione.

Limiti di utilizzo

- Un test sierologico come l'IFA serve come supporto nell'identificazione dell'infezione virale, ma il suo utilizzo non può essere l'unico strumento diagnostico. I risultati del test devono essere quindi correlati con il profilo clinico ed epidemiologico dei pazienti ed altri risultati clinici di laboratorio.
- Reazioni positive non specifiche quali anticorpi antinucleo e/o reazioni anticorpali anticitoplasmiche possono essere riscontrate in campioni da pazienti con determinate malattie autoimmuni. Sia le cellule infette che non infette saranno fluorescenti e questo può mascherare una reazione positiva. Di conseguenza, la presenza di una reazione autoimmune non può escludere la possibilità di infezione da HHV-6.
- Un campione prelevato in una fase troppo precoce dell'infezione può contenere livelli non rilevabili di anticorpo IgM. Se esiste il sospetto di un'infezione virale, un secondo campione dovrebbe essere prelevato nei 7-14 giorni successivi. Il secondo campione dovrebbe essere esaminato contemporaneamente al primo per evidenziare la sierconversione o un aumento significativo del titolo di IgM e IgG specifiche. Sia la sierconversione che l'aumento significativo del titolo sono indicativi di un'infezione primaria.

HHV-6 IgM IFA, Catalogo nr: V17HHV6, HHV-426-03 07/09, IT

- A causa della possibilità di contaminazione del sangue da cordone ombelicale con le IgM materne, è preferibile confermare i risultati positivi all'anticorpo IgM su campioni di cordone ombelicale testando un campione prelevato dal bambino in un secondo tempo, preferibilmente entro i primi 5 giorni di vita.
- Anticorpi IgM specifici vengono solitamente rilevati in pazienti con un'infezione primaria recente. Anticorpi IgM possono essere rilevati in pazienti con infezioni recidivanti o secondarie.
- Biotrin raccomanda di pretrattare i campioni per eliminare l'anticorpo IgG. Questo passaggio aggiuntivo elimina i falsi negativi e i falsi positivi. Infatti se gli anticorpi IgG competono con gli anticorpi IgM per i punti di legame specifici, gli stessi possono causare un risultato falsamente negativo. Quando invece gli anticorpi IgG formano con il substrato antigenico immunocomplessi che possono in seguito legare anche il fattore reumatoide (di classe IgM), si può ottenere un risultato falsamente positivo.

Performance del test

Sensibilità e specificità

Sensibilità diagnostica

Sono stati testati 9 campioni positivi di HHV-6 IgM usando Biotrin HHV-6 IgM IFA. I 9 campioni risultati positivi manifestano una sensibilità del 100%.

$$\% \text{ Sensibilità} = \text{Veri positivi} / (\text{Veri positivi} + \text{Falsi negativi} + \text{Equivoco}) \times 100\%$$

$$\% \text{ Sensibilità} = 9 / (9 + 0) \times 100$$

$$\% \text{ Sensibilità} = 100\%$$

Specificità diagnostica

Sono stati testati 77 campioni di siero da donatori normali per rilevare HHV-6 IgM usando Biotrin HHV-6 IgM IFA. 76 sono risultati negativi agli anticorpi di HHV-6 IgM. La specificità del 99% è stata ottenuta sulla base della seguente equazione:

$$\% \text{ Specificità} = \text{Veri negativi} / (\text{Veri negativi} + \text{Falsi positivi} + \text{Equivoco}) \times 100\%$$

$$\% \text{ Specificità} = 76 / (76 + 1) \times 100$$

$$\% \text{ Specificità} = 99\%$$

Cross Reattività

Per stabilire la specificità di Biotrin HHV-6 IgM IFA, sono stati testati 17 campioni di siero. La tabella che segue riassume i risultati ottenuti da campioni di siero di pazienti con patologie indicate di seguito.

<u>Virus</u>	Numero di campioni positivi con HHV- 6 IgM IFA Biotrin
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

HHV-6 IgM IFA, Catalogo nr: V17HHV6, HHV-426-03 07/09, IT

Tab. 1: Totale delle cross reazioni potenziali che non hanno reagito con gli anticorpi IgM anti Herpesvirus tipo-6.

Interferenze (specificità analitica)

Studi sull'interferenza hanno incluso test per emolisi, lipemia, bilirubina e fattore reumatoide. E' stata rilevata una colorazione di contrasto rosso mattone su tutti i vetrini colorati e l'interpretazione dell'intensità della fluorescenza non ha subito interferenze.

Riproducibilità

Intra-serie

Un campione positivo è stato testato 15 volte con 2 lotti diversi. V. Tab. 2

Controlli	Lotto 1	Lotto 2
CP	2+	2+
CN	0	0
PBS	0	0
Campione positivo	Lotto 1	Lotto 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+

Tab. 2: Campione testato 15 volte su 2 lotti.

Un gruppo di campioni è stato analizzato dieci volte con due lotti diversi. V. Tab. 3.

Lotto 1

Campioni	Spec	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Test 7	Test 8	Test 9	Test 10
CP	2+-4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
CN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Positivo	≥1+	2+	1+	1+/2+	1+/2+	2+	2+	2+	2+	1+/2+	2+
Positivo	≥1+	2+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+/2+	2+
Negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativo	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+

Lotto 2

Campioni	Spec	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Test 7	Test 8	Test 9	Test 10
CP	2+-4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+/3+	2+	2+	2+	2+
CN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Positivo	≥1+	2+	2+	2+	1+2+	1+/2+	2+	2+	2+	2+	2+
Positivo	≥1+	2+	1+/2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
Negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativo	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+

Tab. 3: I risultati mostrano un gruppo di campioni testati 10 volte con 2 lotti differenti.

Sintesi della procedura HHV- 6 IgM IFA

Nota importante:

Leggere interamente le istruzioni per l'uso del prodotto prima di iniziare il test.
Questa sintesi è da considerarsi solo come riferimento rapido



Determinazione qualitativa: Diluire il campione 1:10 con adsorbente IgG
Determinazione semi-quantitativa: Iniziare con una diluizione del campione 1:20 con adsorbente IgG e quindi aggiungere volumi uguali di campione diluito e tampone di lavaggio per ogni successiva diluizione.



Aggiungere 1 goccia (~20µl) di controllo positivo al pozzetto #1 del vetrino
Aggiungere 1 goccia (~20µl) di controllo negativo al pozzetto #2 del vetrino
Aggiungere 1 goccia (~20µl) di campione diluito ai rimanenti pozzetti (un campione per pozzetto)



Incubare il vetrino a 35-39°C per 3 ore



Lavare il vetrino con tampone di lavaggio



Aggiungere 1 goccia (20µl) di coniugato ad ogni pozzetto



Incubare il vetrino a 35-39°C per 30 minuti



Lavare il vetrino con tampone di lavaggio



Mettere 1 goccia scarsa (~10µl) di mezzo di montaggio in ogni pozzetto e coprire con un vetrino coprioggetto



Esaminare il vetrino sotto un microscopio a fluorescenza









Riferimenti

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

HHV-6 IgM IFA, Catalogo nr: V17HHV6, HHV-426-03 07/09, IT
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.

Interpretazione dei simboli

Dispositivo medico diagnostico <i>in-vitro</i>	
Codice del lotto	
Numero di codice	
Limite di temperatura	
Da usare entro	
Produttore	
Nocivo se ingerito. Il contatto con gli acidi libera gas molto tossici.	
Istruzioni per l'uso	

Altri prodotti Biotrin disponibili

Biotrin International offre un ricco portfolio di test per Herpesvirus umano per la diagnosi di routine in laboratorio.

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



Per informazioni supplementari su questo o su qualsiasi altro prodotto si rimanda al nostro sito web

www.biotrin.com