

HHV-8 IgG EIA, Kat.-Nr: V19HHV8, HHV-428-03 07/09, DE



DEUTSCH

Katalog-Nr: V19HHV8
Ausrüstung-Format: 96 well plates
HHV-428-03



Humanes Herpesvirus - 8 IgG-EIA

Enzymimmunttest zum qualitativen Nachweis von IgG-Antikörpern
gegen das Humane Herpesvirus-8 in humanem Serum und Plasma.



Inhalt

Verwendungszweck

Einleitung

Testprinzip

Vorsichtsmaßnahmen

Sicherheit

Allgemeines zur Testdurchführung

Bestandteile des Kits

Mitgelieferte Materialien

Zusätzlich erforderliche Materialien

Lagerung und Stabilität

Probenentnahme und Lagerung

Vorbereitung der Reagenzien und Proben

Testdurchführung

Interpretation der Ergebnisse

Qualitätskontrollkriterien

Einschränkungen des Tests

Referenzwerte

Leistungsdaten des Tests

Zusammenfassung des HHV-8 IgG-EIA

Literatur

Interpretationen der Symbole

Weitere Produkte von Biotrin

Verwendungszweck

Der Humane Herpesvirus-8 (HHV-8) IgG Bipeptid-Enzymimmuntest dient dem qualitativen Nachweis von IgG-Antikörpern, die sich gegen lytische HHV-8-Antigene in humanem Serum oder Plasma richten. Dieser Nachweis von HHV-8 IgG-Antikörpern kann die Diagnose einer Primärinfektion bzw. einer erneuten Infektion/Reaktivierung mit dem Virus unterstützen oder auf eine frühere HHV-8 Infektion hinweisen.

Einleitung

Das Humane Herpesvirus-8 (HHV-8) ist auch als Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV) bzw. als Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSAH) bekannt. Es gehört zu den Gamma-Herpesviren (Genus Rhadinovirus) und ähnelt in seinem Tropismus für B-Zellen sowie seiner Latenz-Fähigkeit dem Epstein-Barr-Virus (EBV). Aus epidemiologischer Sicht gibt es zwar keinen Beweis dafür, dass HHV-8 ursächlich an der Pathogenese des Kaposi-Sarkoms (KS) beteiligt ist⁽¹⁾, das Virus ist aber bei allen KS-Krankheitsformen nachweisbar: Bei klassischem KS (einer seltenen bösartigen Erkrankung, die vorrangig bei älteren Männern im Mittelmeerraum und Osteuropa auftritt), Afrika-endemischem KS (Lymphadenopathie-assoziiertem KS), Transplantation-assoziiertem KS und AIDS-assoziiertem KS. Bei HIV-positiven Patienten lassen sich vor der Entwicklung eines KS HHV-8-Antikörper nachweisen und kündigen die Erkrankung quasi an⁽²⁾.

Bei der Virusausbreitung spielt die sexuelle Übertragung, speziell bei Homosexuellen, eine wichtige Rolle⁽³⁾. Die Durchseuchungsrate HHV-8 bei Blutspendern liegt in den USA und Nordeuropa bei 5 - 10%⁽⁴⁾, in Italien und den Mittelmeerländern bei 10 - 35%⁽⁵⁾ und in vielen afrikanischen Ländern bei über 50%⁽⁶⁾.

HHV-8 wurde auch mit Körperhöhlenlymphomen (auch als primäre Effusionslymphome, PEL, bezeichnet), Castleman-Tumor, Non-Hodgkin-Lymphom und Multiplem Myelom in Zusammenhang gebracht⁽⁷⁾.

Zurzeit erfolgt die Diagnose einer HHV-8-Infektion durch PCR-Analysen und immunologische Tests wie dem IFT und ELISA. Mit Standard-PCR-Tests lässt sich jedoch nur bei etwa der Hälfte der infizierten Patienten in peripheren Blutzellen HHV-8-DNA nachweisen⁽⁹⁻¹²⁾. Während der PCR-Nachweis also beim Einsatz von DNA aus peripheren Blutzellen als Template nicht hinreichend empfindlich zu sein scheint, haben sich serologische Tests für epidemiologische Studien und die Diagnose von HHV-8-Infektionen als wesentlich erfolgreicher erwiesen, insbesondere beim Nachweis eines früheren Kontakts mit dem Virus^(8,9).

Der HHV-8 IgG-EIA von Biotrin verwendet eine Mischung synthetischer Peptide, die den Nachweis von Antikörpern gegen lytische HHV-8 Virusproteine ermöglicht.

Testprinzip

Der BIOTRIN HHV-8 ELISA ist ein direkter Enzymimmunttest, der auf der Bindung HHV-8-spezifischer Antikörper an die auf Mikroassaystreifen immobilisierten lytischen Peptidantigene basiert. Die spezifisch gebundenen Antikörper werden dann mittels eines gegen humanes IgG gerichteten Peroxidasekonjugats und eine sich anschließende Substratreaktion nachgewiesen. Durch den Einsatz der lytischen Peptidepitope, die von verschiedenen viralen Proteinen stammen, wird sowohl eine hohe Sensitivität als auch Spezifität gewährleistet. Eine Kreuzreaktivität mit HIV ist nicht nachweisbar.

Vorsichtsmaßnahmen

Sicherheit

- Nur zur in vitro-Diagnostik.
- Dieser Test darf nur von qualifiziertem Laborpersonal durchgeführt werden.
- Die auf dem Etikett mit ** gekennzeichneten Reagenzien gelten als POTENTIALL BIOGEFÄHRLICHES MATERIAL. Jede für die Herstellung der positivkontrolle, der negativkontrolle und des Kalibrators (Cut-Off-Kontrolle) eingestzte Blutspende wurde mit einer von der FDA zugelassenen Testmethode auf HbsAg und Antikörper gegen HIV und HCV getestet und negativ befundet. Da jedoch kein Test die Anwesenheit von Infektionserregern mit absoluter Sicherheit ausschließen kann, müssen diese Reagenzien und alle Patientenproben entsprechend den geltenden Sicherheitsbestimmungen gehandhabt werden.
- Einige Reagenzien enthalten Thiomersal, was bei Verzehr Vergiftungen hervorrufen kann.
- Einige Reagenzien enthalten Kathon™ CG, das ätzend sein kann. Die Stopplösung enthält Schwefelsäure, die ebenfalls ätzend wirkt. Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden. Bei Hautkontakt betroffene Stellen sofort mit großen Mengen Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
- Das Substrat enthält TMB, das zu Reizungen der Haut und Schleimhäute führen kann. Sollte die Haut in Berührung mit dem Substrat kommen, betroffene Stelle sofort mit viel Wasser spülen.
- Alle klinischen Proben sowie infiziertes oder potentiell infiziertes Material sollten nach den Regeln der "Guten Laborpraxis" (GLP) gehandhabt und beseitigt werden.
- Reste an Chemikalien oder an Präparations- bzw. Kitbestandteilen sind grundsätzlich als gefährlicher Abfall anzusehen. Alle derartigen Materialien müssen in Übereinstimmung mit den geltenden Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.
- Beim Umgang mit den 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. Das Essen und Trinken ist in Laborräumen nicht gestattet.

Allgemeines zur Testdurchführung

- Wird der Test nicht entsprechend den vorgegebenen Zeit- und Temperaturbedingungen durchgeführt, kann dies zu ungültigen Ergebnissen führen. Alle Tests, die nicht den mehr Vorgaben entsprechen, müssen deshalb wiederholt werden.
- Der Kit oder einzelne Reagenzien dürfen nach Ablauf ihres Verfallsdatums nicht verwendet werden.
- Keine kontaminierten Proben oder Reagenzien verwenden.
- Reagenzien verschiedener Chargen des Kits dürfen nicht miteinander vermischt oder gegeneinander ausgetauscht werden.
- Abweichungen vom mitgelieferten Protokoll zur Testdurchführung können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Alle Reagenzien müssen vor Einsatz in den Test auf Raumtemperatur (+20 bis +25°C) gebracht und gut gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nicht für einen längeren Zeitraum direktem Sonnenlicht ausgesetzt oder bei Temperaturen über +2 bis +8°C aufbewahrt werden.
- Zur Verdünnung des Waschpuffer-Konzentrats wird destilliertes bzw. deionisiertes Wasser hoher Qualität benötigt.
- Für alle Reagenzvorbereitungen immer saubere Glasgeräte oder Einmalartikel verwenden.
- Es dürfen keine Komponenten kontaminiert werden und für jede Probe und Komponente muss eine frische Pipettenspitze verwendet werden.
- Nur das für die Testdurchführung erforderliche Volumen an Konjugat entnehmen. Um Kontaminationen zu vermeiden, darf weder unverbrauchtes Reagenz in die Flasche zurückgegossen noch das Reagenz direkt aus der Flasche pipettiert werden.
- Die Reagenzzugabe sollte am seitlichen Innenrand der Wells erfolgen, ohne diese Stelle mit der Pipettenspitze zu zerkratzen.
- Zu keinem Zeitpunkt der Testdurchführung dürfen die Wells austrocknen.
- Die Oberfläche der Mikroassaystreifen um die Wells herum immer tropffrei halten. Nach jedem Arbeitsschritt Streifen rund um die Wells vorsichtig mit saugfähigem Papier trocknen.
- Die Unterseite der Mikroassayplatte muss vor dem Ablesen der Extinktionswerte sauber und trocken sein.
- Vor der Testdurchführung sollte ein genauer Pipettierplan mit Plattenschema erstellt werden.
- Seren dürfen nicht Hitze-inaktiviert werden.
- Die Mikroassaystreifen sollten bis zum Gebrauch in ihrem schützenden Beutel bleiben.

Bestandteile des Kits

Mitgelieferte Materialien

1. Beschichtete ELISA-Platte

PLA	IgG
-----	-----

12 x 8 wells, beschichtet mit an Streptavidin biotinylierten lytischen HHV-8-Peptiden
2. Positivkontrolle**(Rote Verschlusskappe)

CONTROL	+	IgG
---------	---	-----

1 x 2ml positives Humanserum oder –plasma, vorverdünnt in stabilisierendem Puffer (enthält 0,01% Natriumazid, 0,01% Thiomersal)
3. Negativkontrolle**(Grüne Verschlusskappe)

CONTROL	-	IgG
---------	---	-----

1 x 2ml negatives Humanserum oder –plasma, vorverdünnt in stabilisierendem Puffer (enthält 0,01% Natriumazid, 0,067% Kathon™ CG)
4. Cut-off-Kalibrator**(Braune Verschlusskappe)

CAL

1 x 2ml schwach positives Humanserum oder –plasma, vorverdünnt in stabilisierendem Puffer (enthält 0,01% Natriumazid, 0,067 Kathon™ CG)
5. Enzymkonjugat-Verdünnungslösung

CONJ	ENZ	DIL
------	-----	-----

1 x 17ml IgG-Enzymkonjugat-Verdünnungslösung (enthält 0,01% Gentamycinsulfat, 0,01% Thiomersal)
6. Enzymkonjugat-Konzentrat

CONJ	ENZ	10X
------	-----	-----

1 x 1,7ml IgG-Enzymkonjugat-Konzentrat (enthält 0,01% Gentamycinsulfat, 0,01% Thiomersal)
7. Probenverdünnungslösung (Gebrauchsfertig)

DIL	SPE	1X
-----	-----	----

1 x 110ml PBS-Puffer mit Stabilisatoren und Kathon™ CG (0,067%).
8. Wasch-Konzentrat

BUF	WASH	25X
-----	------	-----

1 x 55ml konzentrierter (25X) Tris-Puffer mit Tween 20 (2,75%) und Kathon™ CG (0,067%).
9. Substrat

SUBS	TMB
------	-----

1 x 17ml Tetramethylbenziden (TMB)-Lösung
10. Stopplösung

SOLN	STP
------	-----

1 x 17ml 0,5M H₂SO₄
11. Arbeitsanleitung



**** Potentiell Biogefährliches Material**

Kathon™ CG ist ein eingetragenes Warenzeichen der Rohm and Haas Company.

Zusätzlich erforderliche Materialien

- Gerätschaften zur Serumgewinnung.
- Qualitativ hochwertiges destilliertes oder deionisiertes Wasser.
- Saubere maßanalytische Laborartikel.
- Teströhrchen oder Vergleichbares zur Probenvorbereitung.
- Messzylinder.
- Pipetten, Mikropipetten und Einmalspitzen zum exakten Pipettieren folgender Volumina: 10µl, 100µl, 1ml und 5ml.
- Plastikdeckel oder Abdeckfolie für Mikroassayplatte.
- Stoppuhr.
- Manuelles oder automatisches Waschsysteem.
- Brutschrank, +35 bis +39°C.
- Papiertücher oder saugfähiges Papier.
- ELISA-Plattenreader mit Filter der Wellenlänge 450nm (zusätzlicher 630–650nm-Filter ist optional).

Lagerung und Stabilität

- Der Kit ist bei Lagerung bei +2 bis +8°C bis zu dem auf dem äußeren Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.
- Die 8-Well-Mikroassaystreifen sollten bis zum Gebrauch zusammen mit dem Trockenmittel in dem wiederverschließbaren Beutel aufbewahrt werden.
- Alle nicht verwendeten Komponenten sollten unmittelbar nach Entnahme der nötigen Mengen wieder bei +2 bis +8°C gelagert werden.
- Die rekonstituierte Waschlösung ist bei Lagerung bei +2 bis +8°C 1 Monat stabil.

Probenentnahme und Lagerung

Mit dem Biotrin HHV-8 IgG-EIA können sowohl Serum- als auch Plasmaproben analysiert werden. Man lässt das mittels Venenpunktion gewonnene Blut bei Raumtemperatur (+20 bis +25°C) gerinnen und zentrifugiert das Koagulat dann 10 min bei 1500 x g ab. Falls es nicht innerhalb von 8 Stunden getestet wird, kann das Serum oder Plasma für 2-3 Tage bei +2 bis +8°C bzw. bei länger erforderlicher Lagerung oder für den Versand bei -20°C eingefroren werden (bei -20°C sind die Proben mindestens 1 Jahr stabil). Mit Citrat behandeltes Plasma beeinträchtigt den Test nicht, mikrobiell kontaminierte Seren hingegen dürfen nicht in den Test eingesetzt werden. Die zu testenden Proben dürfen nicht wiederholt aufgetaut und wieder eingefroren werden.

Hinweis: Die Proben sollten nicht Hitze-inaktiviert werden.

Vorbereitung der Reagenzien und Proben

Vorbereitung der Reagenzien

- Die Reagenzvolumenta sind für Einzelbestimmungen berechnet.
- Waschlösung
Für jeden 8-Well-Streifen 4ml Waschpuffer-Konzentrat zu 96ml deionisiertem Wasser geben. Die verdünnte Waschlösung ist bei Lagerung bei +2 bis +8°C 1 Monat haltbar.
- Enzymkonjugat
Für jeden 8-Well-Streifen 100µl Enzymkonjugat zu 900µl Enzymkonjugat-Verdünnungslösung geben. Diese verdünnte Lösung sollte nicht aufbewahrt werden.

Alle übrigen Reagenzien sind gebrauchsfertig, d.h. in ihrer Arbeitsverdünnung.

Vorbereitung der Proben

Für jede Probe 1ml Probenverdünnungslösung in ein beschriftetes Teströhrchen oder Vergleichbares pipettieren. Dann 10µl Serum oder Plasma zugeben und mischen.

Hinweis: Verdünnte Proben sollten nicht aufbewahrt werden; ist eine Wiederholung des Tests erforderlich, sollte eine frisch vorbereitete Probe eingesetzt werden.

Testdurchführung

1. Alle Komponenten sollten vor Testdurchführung Raumtemperatur (+20 bis +25°C) erreicht haben.
2. Ermitteln Sie die erforderliche Anzahl an 8-Well-Streifen und erstellen Sie wie unten (Abb.1) angegeben einen Pipettierplan für die Kontrollen und Proben. Auf dem ersten Streifen lassen sich 2 Patientenproben analysieren, jeder weitere Streifen ermöglicht die Analyse weiterer 8 Patientenproben.

Abb. 1

Streifen 1

A		Negativkontrolle
B		Negativkontrolle
C		Cut-off-Kalibrator
D		Cut-off-Kalibrator
E		Positivkontrolle
F		Positivkontrolle
G		Patient Nr. 1
H		Patient Nr. 2

3. Entnehmen Sie die benötigte Anzahl an Mikrowells aus dem Folienbeutel, setzen Sie sie in den Streifenhalter ein und decken Sie sie mit einem Plastikdeckel bzw. einer Folie ab. Geben Sie die verbleibenden Streifen in den Beutel mit dem Trockenmittel zurück.

4. Herstellung der Waschlösung (siehe "Vorbereitung der Reagenzien und Proben").
5. Herstellung der Patientenproben (siehe "Vorbereitung der Reagenzien und Proben").
6. Entfernen Sie die Abdeckung von den Streifen und pipettieren Sie in jeweils 2 Wells 100µl der gebrauchsfertigen Negativkontrolle, des Cut-off-Kalibrators sowie der Positivkontrolle (jeweils Doppelbestimmungen) und in je 1 Well jeweils 100µl der vorbereiteten Patientenproben (Einzelbestimmungen).
7. Wells mit einem Plastikdeckel bzw. einer Folie abdecken und 30 min bei +35 bis +39°C inkubieren.
8. Abdeckung entfernen und jedes Well 4x mit Waschlösung (250 - 300µl) waschen. Nach dem Waschen Platte auf einem saugfähigen Papier trockenklopfen.
9. Herstellung des Enzymkonjugats (siehe "Vorbereitung der Reagenzien und Proben").
10. Unmittelbar nach Abschluss des Waschschriffs in jedes Well 100µl des vorbereiteten IgG-Enzymkonjugats pipettieren.
11. Wells mit einem Plastikdeckel bzw. einer Folie abdecken und 30 min bei +35 bis +39°C inkubieren.
12. Abdeckung entfernen und jedes Well 4x mit Waschlösung (250 - 300µl) waschen. Nach dem Waschen Platte auf einem saugfähigen Papier trockenklopfen.
13. Unmittelbar nach Abschluss dieses Waschschriffs in jedes Well 100µl TMB-Substrat pipettieren.
14. Wells mit einem Plastikdeckel bzw. einer Folie abdecken und exakt 30 min bei +35 bis +39°C inkubieren.
15. In der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeitabstand wie bei der TMB-Zugabe in jedes Well 100µl Stopplösung geben und mischen.
16. Sofort Extinktion mit einem ELISA-Plattenreader ablesen.

Hinweis: Empfohlen wird das Ablesen bei zwei Wellenlängen, und zwar bei 450 nm und der Referenzwellenlänge 630 nm. Verfügt der ELISA-Plattenreader nicht über diese Funktion, nur Werte bei 450 nm ablesen.

Interpretation der Ergebnisse

Die An- bzw. Abwesenheit von HHV-8 IgG-Antikörpern wird anhand des Vergleichs mit dem Cut-off-Kalibrator bestimmt.

Berechnung des Cut-off-Kalibrator (COC)-Werts

- 1) Bestimmung des Cut-off-Werts (COV) durch Analyse des Kalibrators in jedem Test in Doppelbestimmung.
- 2) Bestimmung des OD-Mittelwerts, dieser Wert ist der COC-Wert und wird zur Bestimmung der Index-Werte benutzt.
- 3) Der Index-Wert wird durch Division der Extinktion der Probe/Kontrolle durch den COC berechnet.

Interpretation (1): Extinktion

Proben mit einer Extinktion größer $\text{COC} \times 1,2$ gelten als reaktiv (positiv); sie enthalten IgG-Antikörper gegen HHV-8.

Proben, die eine Extinktion kleiner $\text{COC} \times 0,8$ zeigen, gelten als nicht-reaktiv (negativ); sie enthalten keine nachweisbaren IgG-Antikörper gegen HHV-8.

Bei Proben mit einer Extinktion größer oder gleich $\text{COC} \times 0,8$ und kleiner oder gleich $\text{COC} \times 1,2$ ist das Ergebnis nicht eindeutig zu bewerten.

Interpretation (2): Index-Wert

Ein Vergleich zwischen Testläufen wird durch Verwendung eines Index-Wertes erleichtert, wobei die Absorption der Probe in Relation zum Cut-off-Kalibrator gesetzt wird. In dem vorliegenden Fall gibt der Index-Wert $<0,8$ bzw. $>1,2$ an, dass die Probe negativ bzw. positiv ist. Ein nicht eindeutiges Ergebnis liegt vor, wenn $0,8 \leq \text{Index-Wert} \leq 1,2$

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorption Kontrolle/Probe}}{\text{MW absorption Cut-off-Kalibrator (COC)}}$$

Proben, die weder positiv noch negativ sind, gelten als nicht eindeutig und müssen ein zweites Mal getestet werden. Ist das Ergebnis wieder mehrdeutig, sollte 7-14 Tage später eine zweite Probe entnommen und getestet werden. Ein nicht eindeutiges Testergebnis mit dieser zweiten Probe kann als nicht reaktiv (negativ) gegenüber HHV-8 IgG-Antikörpern gewertet werden; besteht allerdings Verdacht auf eine frische Infektion, sollte das Testergebnis mit einer alternativen Methode kontrolliert werden.

Qualitätskontrollkriterien

Positiv- und Negativkontrollen müssen bei jedem Testansatz mitbestimmt werden, um die Gültigkeit der Ergebnisse bewerten zu können. Die Ergebnisse eines Tests gelten als gültig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

1. Der Index-Mittelwert der Positivkontrollen ist größer oder gleich einem Index von 1,2.
2. Der Index-Mittelwert der Negativkontrollen ist kleiner als ein Index von 0,8.

Werden die oben genannten Kriterien nicht erfüllt, gilt der Test als ungültig und muss wiederholt werden.

Einschränkungen des Tests

- Zur Diagnostizierung einer HHV-8-Infektion müssen die Ergebnisse dieses Tests mit dem klinischen und epidemiologischen Profil des Patienten und weiteren Laborergebnissen korreliert werden.
- Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit einer HHV-8-Infektion nicht aus. Die Entwicklung einer nachweisbaren Immunantwort erfolgt eventuell erst einige Tage nach der Infektion. Bei Verdacht auf eine HHV-8-Infektion sollte ein negatives Testergebnis nach zwei Wochen mit frischem Probenmaterial überprüft werden.
- Zur Interpretation von Testergebnissen, bei denen andere Körperflüssigkeiten oder gepoolte Seren/Plasma eingesetzt wurden, liegen nicht genügend Daten vor.
- Die Leistungsfähigkeit des Tests kann durch Abweichungen vom Durchführungsprotokoll, bei der Interpretation oder den empfohlenen Sicherheitsmaßnahmen beeinträchtigt werden.
- Die Leistungsfähigkeit des Tests wurde anhand der Analyse der Kontrollen in Doppelbestimmung und der Proben in Einfachbestimmung validiert.

Referenzwerte

Seroprävalenz

Die Verbreitung einer Krankheit wird üblicherweise nach intensiver Analyse der spezifischen Antikörperspiegel in allen Bevölkerungsgruppen bestimmt, und zwar unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, geographischer Lage und sozio-ökonomischem Status.

Die Durchseuchungsrate hinsichtlich HHV-8 liegt bei Blutspendern in den USA und Nordeuropa bei 5 - 10%⁽⁴⁾, in Italien und den Mittelmeerländern bei 10 - 35%⁽⁵⁾ und in vielen afrikanischen Ländern bei über 50%⁽⁶⁾.

Leistungsdaten des Tests

Sensitivität und Spezifität

Zur Sensitivitätsbestimmung des HHV-8 IgG-Tests wurden 166 Proben von Patienten, die die klinischen Symptome einer HHV-8-Infektion und eines Kaposi-Sarkoms aufwiesen, untersucht. Eine Reihe dieser Proben war auch mit einem HHV-8 IgG-IFT untersucht und positiv befundet worden. Zur Spezifitätsbestimmung des HHV-8 IgG-EIA wurden insgesamt 114 Proben analysiert, von denen 114 von gesunden Personen stammten. Alle waren zuvor mit verschiedenen handelsüblichen HHV-8 IgG-Tests negativ befundet worden.

HHV-8 Status	Positiv	Negativ	Nicht eindeutig	Insgesamt
Positiv	150	2	14	166
Negativ	3	106	5	114
Insgesamt	153	108	19	280

Tabelle 1: Die Ergebnisse zur Sensitivität und Spezifität wurden erzielt.

Sensitivität: $150/166=90.4\%$
 Spezifität: $106/114=93\%$
 Übereinstimmung: $256/280 = 91.4\%$

Sensitivität = $\frac{\text{eindeutig positive Proben}}{\text{positive+falsch negative+mehrdeutige}} \times 100$
 $= \frac{150}{166} \times 100 = 90.4\%$

Spezifität = $\frac{\text{eindeutig negative Proben}}{\text{negative+falsch positive+mehrdeutige}} \times 100$
 $= \frac{106}{114} \times 100 = 93\%$

Reproduzierbarkeit innerhalb eines Testlaufs (Intra-Assay):

Eine Reihe von Serumproben, deren HHV-8 IgG-Spiegel von schwach positiv bis stark positiv reichte, wurde insgesamt zwanzig Mal getestet. Die Replikate wurden auf drei ELISA-Platten mit drei überprüften Produktchargen analysiert. Die erzielten OD-Werte wurden addiert und die OD-Mittelwerte sowie die Standardabweichungen (SD) und der prozentuale Variationskoeffizient (% VK) berechnet (siehe Tabelle 2). In Tabelle 3 sind die gleichen Ergebnisse als Index-Werte wiedergegeben.

Der prozentuale VK, ausgedrückt in OD (Indizes) bewegte sich im Bereich von 7,28% in einer stark positiven Probe (SR) bis zu 8,022% in einer schwach positiven Probe (WR) .

Proben	1			2			3		
	Mittlere OD	SD	% VK	Mittlere OD	SD	% VK	Mittlere OD	SD	% VK
SR	1.384	0.101	7.28	1.240	0.036	2.872	1.370	0.049	3.543
WR1	0.292	0.013	1.479	0.461	0.012	2.648	0.556	0.023	4.187
WR2	0.185	0.013	7.000	0.493	0.040	8.022	0.362	0.026	7.246

Tabelle 2: Intra-Assay-Reproduzierbarkeit, ausgedrückt als optische Dichte (OD). Analysiert wurden 3 verschiedene Serumproben mit schwach bis stark positivem HHV-8-Spiegel in je 20 Wiederholungen mit 3 unterschiedlichen Chargen. SR: stark reaktiv; WR: schwach reaktiv

Proben	1			2			3		
	Mittlerer Index	SD	% VK	Mittlerer Index	SD	% VK	Mittlerer Index	SD	% VK
SR	7.58	0.55	7.28	6.776	0.195	2.872	5.054	0.179	3.543
WR1	1.60	0.07	4.48	2.517	0.067	2.648	2.053	0.086	4.187
WR2	1.01	0.07	7.00	2.695	0.216	8.022	1.335	0.097	7.246

Tabelle 3: Intra-Assay-Reproduzierbarkeit, ausgedrückt als Index-Wert. Analysiert wurden 3 verschiedene Serumproben mit schwach bis stark positivem HHV-8-Spiegel in je 20 Wiederholungen mit 3 unterschiedlichen Chargen. SR: stark reaktiv; WR: schwach reaktiv

Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Testläufen (Inter-Assay):

Eine Reihe von Serumproben mit HHV-8 IgG-Spiegeln von nicht reaktiv bis stark reaktiv wurden in 10 Testansätzen von drei verschiedenen durchführenden Personen jeweils in Doppelbestimmung analysiert. Die Proben wurden mit einer Produktcharge getestet und die Ergebnisse anschließend zur Bestimmung der Inter-Assay-Reproduzierbarkeit kombiniert. Insgesamt wurde jede Probe also n=10 getestet. Die erzielten OD-Werte wurden addiert und die OD-Mittelwerte sowie die Standardabweichungen (SD) und der prozentuale Variationskoeffizient (% VK) berechnet (siehe Tabelle 4). In Tabelle 5 sind die gleichen Ergebnisse als Index-Werte wiedergegeben.

Der prozentuale VK, ausgedrückt in OD (Indizes) bewegte sich im Bereich von 7,04% einer stark positiven Probe bis zu 15,84% einer schwach positiven Probe.

Proben	Mittlere OD	SD	%VK	n
SR	1.429	0.101	7.04	10
MR	0.500	0.076	15.27	10
WR	0.319	0.051	15.84	10
NR1	0.058	0.008	13.13	10
NR2	0.061	0.011	18.19	10

Tabelle 4: Inter-Assay-Reproduzierbarkeit, ausgedrückt als optische Dichte (OD). Analysiert wurden 6 verschiedene Serumproben mit HHV-8-Spiegeln von nicht-reaktiv bis stark reaktiv in 7 Testansätzen mit 3 verschiedenen Chargen, und zwar jeweils in Doppelbestimmung. SR: stark reaktiv; WR: schwach reaktiv, NR: nicht reaktiv

Proben	Mittlerer Index	SD	%VK	n
SR	8.397	0.704	8.38	10
MR	2.934	0.436	14.87	10
WR	1.879	0.323	17.21	10
NR1	0.342	0.046	13.54	10
NR2	0.361	0.064	17.83	10

Tabelle 5: Inter-Assay-Reproduzierbarkeit, ausgedrückt als Index. Analysiert wurden 5 verschiedene Serumproben mit HHV-8-Spiegeln von nicht-reaktiv bis stark reaktiv in 10 Testansätzen. SR: stark reaktiv; WR: schwach reaktiv; NR: nicht reaktiv

Kreuzreaktivität:

Zur Bestimmung der Spezifität des Biotrin HHV-8 IgG-EIA wurden 76 Serumproben gescreent; sie stammten von Patienten, bei denen folgende Krankheiten diagnostiziert worden waren:

Virus	Anzahl and Positiven
Lupus Erythematosus	0/5
Rhematoid Arthritis (RA)	0/3
Rhematoid Factor (RF)	0/5
Autoimmune	1/7
Lyme IgG	0/4
EBV IgG	2/24
Rubella IgG	0/5
CMV IgG	0/5
VZV IgG	2/5
Hep C	0/2
HIV	0/5
HTLV	0/2
HSV IgG	0/4

Tabelle 6: n = 76 potentiell kreuzreagierende Proben, die zur Ermittlung unspezifischer Bindungen analysiert wurden. Angegeben ist die Anzahl der insgesamt getesteten Proben sowie der falsch-positiv befundeten Proben.

Zusammenfassung des HHV- 8 IgG-EIA

Lesen Sie bitte vor Beginn der Testdurchführung die gesamte Produktbeschreibung durch. Diese Zusammenfassung dient ausschließlich dem Überblick.

Waschpuffer vorbereiten



Proben 101 in Probenverdünnungspuffer verdünnen



In jeweils 2 Wells (Doppelbestimmung) 100µl (gebrauchsfertige)
Negativkontrolle, Cut-off-Kalibrator, Positivkontrolle pipettieren



In je 1 Well (Einzelbestimmung)
100µl der vorbereiteten Probe pipettieren



30 min bei +35 bis +39°C inkubieren



Streifen 4 x mit Waschpuffer waschen



Enzymkonjugat vorbereiten



100µl IgG-Enzymkonjugat zupipettieren



30 min bei +35 bis +39°C inkubieren



Streifen 4 x mit Waschpuffer waschen



100µl TMB-Substrat zugeben



30 min bei +35 bis +39°C inkubieren



100µl Stopplösung zugeben











Extinktion bei 450nm ablesen und (falls verfügbar) bei der Referenzwellenlänge
630nm

Literatur

1. The Role of HHV-8 in Kaposi's Sarcoma. Neipel F and Fleckenstein B. *Semin Cancer Biol.* 1999; 9(3):151-164.
2. Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. Gao et al. *N Engl. J of Med* 1996; 335:233-41.
3. Risk factors for Human Herpesvirus-8 seropositivity and seroconversion in a cohort of homosexual men. Dukers et al. *American J of Epidemiology* 2000; 151, 213-24.
4. KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. Gao SJ et al. *Natl Med* 1996; 2:925-8.
5. Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy. Whitby D et al. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:395-7.
6. Antibodies against human herpesvirus 8 in black South African patients with Cancer. Sitas F et al. *N Engl. J of Medicine* 1999; 340:1863-71.
7. Kaposi's sarcoma after renal transplantation. Camille Frances. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 2768-2773.
8. The Role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV / HHV-8) in lymphoproliferative diseases. Cesarman E, Knowles, D. M. *Cancer Biology* 1999; 9, 165-174.
9. Detection of Human Herpesvirus-8 DNA in kaposi's sarcoma lesions and peripheral blood of human immunodeficiency virus-positive patients and correlation with serological measurements. Smith M.S. et al. *J of Infect Dis* 1997; 176:84-93.
10. Comparison of serological assays and PCR for Diagnosis of Human herpesvirus 8 Infection. Spira TJ et al. *J of Clinical Microbiology* 2000; 38 (6): 2174 - 2180.
11. Kaposi's sarcoma. Karen Antman. *Medical Progress* 2000; 342; 14 1027-1037.
12. Chang et al *Science* 265:1865-1869, 1994.

Interpretationen der Symbole

<i>In-vitro</i> Diagnostikum	
Charge	
Katalog-Nr.	
Temperaturbegrenzungen	
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
V3HHV6	Human Herpesvirus-6 IgG-IFA	4 x 10 well slides
V17HHV6	Human Herpesvirus-6 IgM-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