

ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Αρ. Καταλόγου: V19HHV8
Μορφή Κιτ: EIA 96 well plates
HHV-428-03



Ανοσοενζυμική Εξέταση IgG έναντι του Ανθρώπινου Ερπητοϊού-8

Μια ανοσοενζυμική εξέταση για την ποιοτική ανίχνευση των αντισωμάτων
IgG έναντι του ανθρώπινου ερπητοϊού-8 σε ανθρώπινο ορό και πλάσμα.



Πίνακας περιεχομένων

Ενδεικνυόμενη Χρήση

Εισαγωγή

Αρχή της Εξέτασης

Προφυλάξεις
Ασφάλεια
Διαδικασία

Συστατικά του Kit
Παρεχόμενα Υλικά
Πρόσθετα Απαιτούμενα Υλικά

Αποθήκευση και Σταθερότητα

Συλλογή και Αποθήκευση Δειγμάτων

Παρασκευή Αντιδραστηρίων και Δειγμάτων

Διαδικασία της Εξέτασης

Ερμηνεία των Αποτελεσμάτων

Κριτήρια Ελέγχου Ποιότητας

Περιορισμοί Χρήσης

Αναμενόμενες Τιμές

Χαρακτηριστικά Απόδοσης

Σύνοψη της Διαδικασίας Ανοσοενζυμικής Εξέτασης του Ανθρώπινου Ερπητοϊού- 8 IgG

Παραπομπές

Ερμηνεία Συμβόλων

Πρόσθετα Προϊόντα της Biotrin

Ενδεικνυόμενη Χρήση

Η ανοσοενζυμική εξέταση διπεπτιδίου IgG έναντι του ανθρώπινου ερπητοϊού-8 (HHV-8) προορίζεται για την ποιοτική ανίχνευση των αντισωμάτων IgG έναντι των λυτικών αντιγόνων του HHV-8 σε ανθρώπινο ορό ή πλάσμα. Η ανίχνευση του αντισώματος IgG έναντι του HHV-8 σε ανθρώπους μπορεί να χρησιμοποιηθεί επικουρικά στη διάγνωση της κύριας λοίμωξης ή της απενεργοποίησης / επαναλοίμωξης από το συγκεκριμένο ιό ή μπορεί να προσφέρει αποδείξεις προηγούμενης λοίμωξης από HHV-8.

Εισαγωγή

Ο ανθρώπινος ερπητοϊός-8 (HHV-8) είναι επίσης γνωστός ως ερπητοϊός που σχετίζεται με το σάρκωμα Karosi (KSHV). Ο ιός ταξινομείται ως γ-ερπητοϊός (γένος των *gadinovirus*) και μοιάζει με τον ιό Epstein-Barr (EBV) ως προς τον τροπισμό του για κύτταρα B και την ικανότητά του να υπάρχει σε λανθάνουσα κατάσταση. Υπάρχουν πλέον πολύ ισχυρές επιδημιολογικές αποδείξεις για τον αιτιακό ρόλο του HHV-8 στην παθογένεση του σαρκώματος Karosi (KS)⁽¹⁾. Ο HHV-8 είναι ανιχνεύσιμος σε όλες τις μορφές της νόσου: Το κλασικό KS (ένας σπάνιος τύπος κακοήθειας που εμφανίζεται σε ηλικιωμένους άντρες σε μεσογειακές χώρες), το αφρικανικό ενδημικό KS, το KS που σχετίζεται με μεταμοσχεύσεις και το KS που σχετίζεται με το AIDS. Σε ασθενείς θετικούς σε HIV, τα αντισώματα του HHV-8 έχουν εμφανιστεί ότι προϋπάρχουν και προβλέπουν την ανάπτυξη του KS⁽²⁾.

Η μετάδοση μέσω της σεξουαλικής επαφής παίζει σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση του HHV-8 σε ομοφυλόφιλους άντρες⁽³⁾. Ο επιπολασμός του ιού HHV-8 σε δότες αίματος κυμαίνεται μεταξύ 5 -10% στις Ηνωμένες Πολιτείες και τη Β. Ευρώπη⁽⁴⁾, μεταξύ 10 - 35% στην Ιταλία και τις χώρες της Μεσογείου⁽⁵⁾ και σε περισσότερο από 50% σε πολλούς πληθυσμούς της Αφρικής⁽⁶⁾.

Ο HHV-8 έχει, επίσης, συσχετιστεί με λεμφώματα που αναπτύσσονται σε κοιλότητες του σώματος, γνωστά και ως πρωτοπαθή λεμφώματα με συλλογή υγρού (PEL), πολυκεντρική νόσος του Castleman (MCD), μη Hodgkin λέμφωμα και πολλαπλό μυέλωμα⁽⁷⁾.

Προς το παρόν, η λοίμωξη από HHV-8 μπορεί να διαγνωσθεί με ανάλυση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και με ανοσολογικές εξετάσεις, π.χ. IFA και ELISA. Ωστόσο, το DNA του HHV-8 μπορεί να ανιχνευθεί στα κύτταρα του περιφερικού αίματος από το ήμισυ μόνο των ατόμων με λοίμωξη με εφαρμογή τυπικών εξετάσεων PCR⁽⁹⁻¹²⁾. Καθώς τα συστήματα ανίχνευσης PCR εμφανίζουν χαμηλή ευαισθησία όταν χρησιμοποιείται ως πρότυπο το DNA από τα κύτταρα του περιφερικού αίματος, οι ορολογικές εξετάσεις έχουν αποδειχθεί πιο χρήσιμες για τις επιδημιολογικές μελέτες και τη διάγνωση της λοίμωξης από HHV-8, ειδικά για την ανίχνευση προηγούμενης έκθεσης στον ιό^(8,9).

Το κιτ ανοσοενζυμικής εξέτασης Biotrin HHV-8 IgG βασίζεται σε ένα συνθετικό μείγμα πεπτιδίων που επιτρέπει την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι λυτικών ιικών πρωτεϊνών HHV-8.

Αρχή της Εξέτασης

Η μέθοδος BIOTRIN HHV-8 ELISA είναι μια άμεση ανοσοενζυμική εξέταση (EIA) που βασίζεται στη σύνδεση ειδικών αντισωμάτων HHV-8 με λυτικά πεπτιδικά αντιγόνα που ενσωματώνονται σε πλάκες μικροτίτλων. Ειδικά συνδεδεμένα αντισώματα ανιχνεύονται από συνδυαστικό διάλυμα ανθρώπινων αντισωμάτων IgG με υπεροξειδάση και επακόλουθη αντίδραση σε υπόστρωμα. Η χρήση λυτικών πεπτιδικών επιτόπων, που προέρχονται από διαφορετικές ιικές πρωτεΐνες, διασφαλίζει την υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα της εξέτασης. Δεν έχει ανιχνευθεί διασταυρούμενη αντίδραση με τον HIV.

Προφυλάξεις

Ασφάλεια

- Για διαγνωστική χρήση *in vitro* μόνο.
- Αυτό το κιτ προορίζεται για χρήση από εξειδικευμένο εργαστηριακό προσωπικό μόνο
- Τα αντιδραστήρια που επισημαίνονται με ** θεωρούνται ΥΛΙΚΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ. Κάθε μονάδα δότη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή θετικού μάρτυρα, βαθμονομητή ορίου θετικότητας και αρνητικού μάρτυρα ελέγχθηκε με μέθοδο του FDA για HBsAg και αντισώματα έναντι των HIV και HCV και βρέθηκε αρνητική. Ωστόσο, επειδή καμία μέθοδος δοκιμής δεν μπορεί να προσφέρει πλήρη διασφάλιση ως προς την απουσία μολυσματικών παραγόντων, όλα τα αντιδραστήρια και όλα τα δείγματα ασθενών πρέπει να χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις καθιερωμένες διαδικασίες ασφαλείας.
- Μερικά αντιδραστήρια περιέχουν Kathon™ CG, που ενδέχεται να έχει διαβρωτική δράση. Το ανασχετικό διάλυμα περιέχει θειικό οξύ που είναι, επίσης, διαβρωτικό. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια. Σε περίπτωση επαφής, ξεπλύνετε αμέσως με νερό και συμβουλευθείτε γιατρό.
- Μερικά αντιδραστήρια περιέχουν Thiomersal που μπορεί να είναι τοξικό εάν καταποθεί.
- Το υπόστρωμα περιέχει τετραμεθυλβενζιδίνη (TMB) που μπορεί να ερεθίσει το δέρμα και τους βλεννογόνους. Οποιοδήποτε υπόστρωμα που έρχεται σε επαφή με το δέρμα πρέπει να ξεπλένεται με νερό.
- Απορρίψτε όλα τα κλινικά δείγματα, τα μολυσμένα ή ενδεχομένως μολυσμένα υλικά σύμφωνα με την ορθή εργαστηριακή πρακτική. Όλα αυτά τα υλικά πρέπει να χρησιμοποιούνται και να απορρίπτονται ως ενδεχομένως μολυσματικά.
- Τα υπολείμματα χημικών, παρασκευασμάτων και συστατικών κιτ θεωρούνται γενικά επικίνδυνα απόβλητα. Όλα αυτά τα υλικά πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις καθιερωμένες διαδικασίες ασφαλείας.
- Φοράτε προστατευτικά ρούχα, ελαστικά γάντια μιας χρήσης και προστατευτικά ματιών ενώ χρησιμοποιείτε τα δείγματα και πραγματοποιείτε την εξέταση. Πλένετε τα χέρια σας καλά όταν τελειώνετε.
- Μη μεταφέρετε τα υλικά με το στόμα και ποτέ μην τρώτε ή πίνετε κοντά στον πάγκο εργασίας του εργαστηρίου.

Διαδικασία

- Η διεξαγωγή της εξέτασης εκτός των παρεχόμενων ορίων χρόνου και θερμοκρασίας ενδέχεται να οδηγήσει σε μη έγκυρα αποτελέσματα. Οι εξετάσεις που δεν εμπίπτουν στα καθορισμένα όρια χρόνου και θερμοκρασίας πρέπει να επαναλαμβάνονται.
- Μη χρησιμοποιείτε κιτ ή μεμονωμένα αντιδραστήρια που έχουν λήξει.
- Μη χρησιμοποιείτε επιμολυσμένα δείγματα ή αντιδραστήρια.
- Μην αναμιγνύετε ή υποκαθιστάτε αντιδραστήρια από κιτ με διαφορετικούς αριθμούς παρτίδας.
- Η απόκλιση από το παρεχόμενο πρωτόκολλο ενδέχεται να προκαλέσει εσφαλμένα αποτελέσματα.
- Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) και ανακινήστε επαρκώς πριν από τη χρήση.
- Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε άμεσο ηλιακό φως ή/και σε θερμοκρασία άνω των 2-8°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.
- Για το διάλυμα πλύσης απαιτείται αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό υψηλής ποιότητας.
- Χρησιμοποιείτε πάντα καθαρά, κατά προτίμηση γυάλινα δοχεία μίας χρήσης, για την παρασκευή κάθε αντιδραστηρίου.
- Προσέχετε να μην επιμολύνετε τα συστατικά και πάντα χρησιμοποιείτε νέα ρύγχη πιπέτας για κάθε δείγμα και συστατικό.
- Αφαιρείτε μόνο τον όγκο συζευγμένου αντιδραστηρίου που απαιτείται για την εξέταση. Μη ρίχνετε το αντιδραστήριο που δεν έχετε χρησιμοποιήσει ξανά στο δοχείο και μην πιπετάρετε το αντιδραστήριο απευθείας από το δοχείο. Σε αυτή την περίπτωση, ενδέχεται να προκληθεί επιμόλυνση.
- Το αντιδραστήριο πρέπει να φθάνει στο μέσον του πλαϊνού τοιχώματος των βοθρίων. Προσέχετε να μη χαράξετε το πλαϊνό τοίχωμα με το ρύγχος της πιπέτας.
- Μην αφήνετε τα βοθρία να στεγνώσουν σε οποιοδήποτε στάδιο κατά τη διαδικασία της εξέτασης.
- Μην αφήνετε σταγονίδια στην άνω επιφάνεια των βοθρίων. Τα σταγονίδια πρέπει να σκουπίζονται με απορροφητικό σπόγγο μόλις ολοκληρώνεται κάθε βήμα της διαδικασίας.
- Βεβαιωθείτε ότι η κάτω επιφάνεια της πλάκας είναι καθαρή και στεγνή πριν από την ανάγνωση.
- Πριν από την έναρξη της εξέτασης, πρέπει να καθορίζεται ένα πλάνο ταυτοποίησης και κατανομής.
- Μη θερμαίνετε ανενεργούς ορούς.
- Μην αφαιρείτε την πλάκα από το προστατευτικό σακουλάκι της έως ότου είστε έτοιμοι να τη χρησιμοποιήσετε.

Συστατικά του Κιτ

Παρεχόμενα Υλικά

1. Επικαλυμμένη πλάκα ELISA

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

12 x 8 Βοθρία, επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη και βιοτινοποιημένα λυτικά πεπτιδία έναντι του HHV-8.
2. Θετικός μάρτυρας** (Κόκκινο καπάκι/χρώμα)

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

1 x 2ml προ-αραιωμένου θετικού ανθρώπινου ορού ή πλάσματος σε ρυθμιστικό διάλυμα σταθεροποίησης (περιέχει 0,01% αζίδιο του νατρίου, 0,01% Thiomersal).
3. Αρνητικός μάρτυρας** (Πράσινο καπάκι/χρώμα)

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

1 x 2ml προ-αραιωμένου αρνητικού ανθρώπινου ορού ή πλάσματος σε ρυθμιστικό διάλυμα σταθεροποίησης (περιέχει 0,01% αζίδιο του νατρίου, 0,067% Kathon™ CG).
4. Βαθμονομητής ορίου θετικότητας** (Καφέ καπάκι/χρώμα)

CAL

1 x 2ml προ-αραιωμένου ασθενώς θετικού ανθρώπινου ορού ή πλάσματος σε ρυθμιστικό διάλυμα σταθεροποίησης (περιέχει 0,01% αζίδιο του νατρίου, 0,067% Kathon™ CG).
5. Αραιωτικό σύζευξης ενζύμου

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

1 x 17ml αραιωτικού σύζευξης ενζύμου IgG (περιέχει 0,01% θειικής γενταμικίνης, 0,01% Thiomersal).
6. Συμπύκνωμα σύζευξης ενζύμου

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

1 x 1,7ml συμπυκνώματος σύζευξης ενζύμου IgG (περιέχει 0,01% θειικής γενταμικίνης, 0,01% Thiomersal).
7. Αραιωτικό δείγματος (Έτοιμο προς χρήση)

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

1 x 110ml ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS) με σταθεροποιητές και Kathon™ CG (0,067%).
8. Συμπύκνωμα πλύσης

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

1 x 55ml συμπυκνωμένου (25X) ρυθμιστικού διαλύματος TRIS με Tween 20 (2,75%) και Kathon™ CG (0,067%).
9. Υπόστρωμα

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

1 x 17ml διάλυμα τετραμεθυλβενζιδίνης (TMB).

10. Ανασχετικό διάλυμα

SOLN | **STP**

1 x 17ml διαλύματος 0,5M H₂SO₄.

11. Οδηγίες Χρήσης



**** Υλικά Πιθανού Βιολογικού Κινδύνου**

Το Kathon™ CG είναι κατατεθέν εμπορικό σήμα της Rohm and Haas Company.

Πρόσθετα Απαιτούμενα Υλικά

- Εξοπλισμός συλλογής ορού.
- Αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό υψηλής ποιότητας.
- Καθαρά ογκομετρικά δοχεία εργαστηρίου.
- Δοκιμαστικοί σωλήνες ή άλλοι αντίστοιχοι για παρασκευή δείγματος.
- Διαβαθμισμένοι κύλινδροι.
- Πιπέτες ακριβείας, μικροπιπέτες και ρύγχη μίας χρήσης για μέτρηση όγκων 10μl, 100μl, 1ml και 5ml.
- Πλαστικό κάλυμμα ή στεγανοποιητική ταινία για πλάκα βοθρίων.
- Χρονόμετρο.
- Συσκευή για χειρωνακτική ή αυτόματη πλύση.
- Επωαστήρας 35-39°C.
- Χαρτοπετσέτες ή απορροφητικό χαρτί.
- Συσκευή ανάγνωσης πλακών ELISA με φίλτρο 450nm (και πρόσθετο προαιρετικό φίλτρο 630 – 650nm).

Αποθήκευση και Σταθερότητα

- Το kit παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα της εξωτερικής συσκευασίας, εφόσον αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 2-8°C.
- Οι σειρές 8 βοθρίων πρέπει να αποθηκεύονται σε επανασφραγιζόμενη συσκευασία με σακουλάκια αποξηραντικού.
- Όλα τα μη χρησιμοποιημένα συστατικά πρέπει να αποθηκεύονται ξανά σε θερμοκρασία 2-8°C αμέσως μετά τη χρήση.
- Το ανασυσταθέν διάλυμα πλύσης παραμένει σταθερό για 1 μήνα όταν αποθηκεύεται στους 2-8°C.

Συλλογή και Αποθήκευση Δειγμάτων

Στην ανοσοενζυμική εξέταση HHV-8 IgG της Biotrin μπορεί να χρησιμοποιηθεί δείγμα ορού ή πλάσματος. Αφού ληφθεί με φλεβοπαρακέντηση, το αίμα πρέπει να παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) για να δημιουργηθεί πήγμα και στη συνέχεια να φυγοκεντρηθεί σε 1500 x g για 10 λεπτά. Εάν δεν αναλυθεί αμέσως εντός 8 ωρών, ο ορός ή το πλάσμα μπορεί να τοποθετηθεί σε θερμοκρασία 2-8°C για 2-3 ημέρες ή σε κατάψυξη στους -20°C εάν απαιτείται παράταση της αποθήκευσης ή της αποστολής (τα δείγματα παραμένουν σταθερά στους -20°C για τουλάχιστον 1 έτος).

Το κιτρικό πλάσμα είναι συμβατό με τη διαδικασία της δοκιμής. Δεν επιτρέπεται η χρήση μικροβιακά μολυσμένων ορών για τη δοκιμή. Τέλος, τα δείγματα δοκιμής δεν πρέπει να υπόκεινται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης-απόψυξης.

Σημείωση: Δεν συνιστάται η χρήση θερμικά απενεργοποιημένων δειγμάτων.

Παρασκευή Αντιδραστηρίων και Δειγμάτων

Παρασκευή Αντιδραστηρίων

- Οι όγκοι αντιδραστηρίων βασίζονται σε μονή ανάλυση δειγμάτων.
- Διάλυμα πλύσης.
Για κάθε σειρά 8 βοθρίων, προσθέστε 4ml συμπυκνώματος πλύσης σε 96ml απιονισμένου νερού. Το παρασκευασμένο αντιδραστήριο παραμένει σταθερό για 1 μήνα εφόσον αποθηκεύεται στους 2-8°C.
- Παρασκευή συζευγμένου με ένζυμο αντιδραστηρίου.
Για κάθε σειρά 8 βοθρίων, προσθέστε 100ml συμπυκνώματος σύζευξης ενζύμου σε 900ml αραιωτικού σύζευξης ενζύμου. Το παρασκευασμένο διάλυμα δεν πρέπει να αποθηκεύεται.

Όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια παρέχονται έτοιμα προς χρήση και έχουν ήδη αραιωθεί.

Παρασκευή Δειγμάτων

Για κάθε δείγμα, ρίξτε 1ml αραιωτικού δείγματος σε σημασμένο δοκιμαστικό σωλήνα ή άλλο αντίστοιχο δοχείο. Προσθέστε 10μl δείγματος ορού ή πλάσματος και αναμείξτε.

Σημείωση: Τα αραιωμένα δείγματα δεν πρέπει να αποθηκεύονται. Εάν απαιτείται επανάληψη της δοκιμής, πρέπει να χρησιμοποιήσετε φρέσκο παρασκεύασμα.

Διαδικασία της Εξέτασης

1. Αφήστε όλα τα συστατικά να σταθεροποιηθούν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση.
2. Καθορίστε τον αριθμό των βοθρίων που χρειάζεστε. Καθορίστε ένα πλάνο ταυτοποίησης και κατανομής για τους μάρτυρες και τα δείγματα, όπως υποδεικνύεται στο Σχήμα 1 (κατωτέρω). Η πρώτη σειρά είναι κατάλληλη για ανάλυση 2 δειγμάτων ασθενούς, κάθε επιπλέον σειρά επιτρέπει την ανάλυση 8 δειγμάτων ασθενών.

Σχήμα 1 Σειρά 1

A		Αρνητικός μάρτυρας
B		Αρνητικός μάρτυρας
C		Βαθμονομητής ορίου θετικότητας
D		Βαθμονομητής ορίου θετικότητας
E		Θετικός μάρτυρας
F		Θετικός μάρτυρας
G		Ασθενής 1
H		Ασθενής 2

3. Αφαιρέστε τον επιθυμητό αριθμό βοθρίων, τοποθετήστε τα σε πλαστικό πλαίσιο και καλύψτε τα με πλαστικό κάλυμμα / στεγανοποιητική ταινία. Τοποθετήστε τις υπόλοιπες σειρές στο σακουλάκι και σφραγίστε ξανά με αποξηραντικό.
4. Παρασκευάστε το διάλυμα πλύσης (βλ. "Παρασκευή Αντιδραστηρίων και Δειγμάτων").
5. Παρασκευάστε το δείγμα ασθενούς (βλ. "Παρασκευή Αντιδραστηρίων και Δειγμάτων").
6. Αφαιρέστε το κάλυμμα από τις σειρές και πιπετάρετε 100μl, εις διπλούν, από τον έτοιμο προς χρήση αρνητικό μάρτυρα, τον βαθμονομητή ορίου θετικότητας και τον θετικό μάρτυρα και 100μl μία φορά από τα παρασκευασμένα δείγματα ασθενών προς τα βοθρία.
7. Καλύψτε τα βοθρία με πλαστικό κάλυμμα/στεγανοποιητική ταινία και επωάστε για 30 λεπτά στους 35 - 39°C.
8. Αφαιρέστε το κάλυμμα και πλύνετε κάθε βοθρίο 4 φορές με διάλυμα πλύσης (250 - 300μl). Μετά την πλύση, χτυπήστε ελαφρά την πλάκα σε μια απορροφητική χαρτοπετσέτα.

9. Παρασκευάστε το συζευγμένο με ένζυμο αντιδραστήριο (βλ. "Παρασκευή Αντιδραστηρίων και Δειγμάτων").
10. Πιπετάρετε 100μl του παρασκευασμένου συζευγμένου με ένζυμο IgG αντιδραστηρίου σε όλα τα βοθρία, αμέσως μόλις ολοκληρωθεί η πλύση.
11. Καλύψτε τα βοθρία με πλαστικό κάλυμμα/στεγανοποιητική ταινία και επωάστε για 30 λεπτά στους 35 - 39°C.
12. Αφαιρέστε το κάλυμμα και πλύνετε κάθε βοθρίο 4 φορές με διάλυμα πλύσης (250 - 300μl). Μετά την πλύση, χτυπήστε ελαφρά την πλάκα σε μια απορροφητική χαρτοπετσέτα.
13. Πιπετάρετε 100μl του υποστρώματος TMB σε όλα τα βοθρία μόλις ολοκληρωθεί η πλύση.
14. Καλύψτε τα βοθρία με πλαστικό κάλυμμα/στεγανοποιητική ταινία και επωάστε για 30 λεπτά ακριβώς στους 35 - 39°C.
15. Πιπετάρετε 100μl του ανασχετικού διαλύματος σε όλα τα βοθρία και αναμείξτε. Βεβαιωθείτε ότι κάθε προσθήκη γίνεται στην ίδια σειρά και το χρονικό διάστημα όπως η προσθήκη του υποστρώματος.
16. Διαβάστε αμέσως τα αποτελέσματα με συσκευή ανάγνωσης πλακών ELISA.

Σημείωση: Η ανάγνωση διπλού μήκους κύματος συνιστάται στα 450nm με 630nm ως μήκος κύματος αναφοράς. Εάν η συγκεκριμένη λειτουργία δεν διατίθεται στη συσκευή ανάγνωσης πλακών ELISA, χρησιμοποιήστε ανάγνωση σε μονό μήκος κύματος στα 450nm.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η παρουσία ή η απουσία του αντισώματος IgG έναντι του HHV-8 προσδιορίζεται σε σχέση με το βαθμονομητή ορίου θετικότητας (COC).

Τιμή βαθμονομητή ορίου θετικότητας

- 1) Προσδιορίστε την τιμή του COC αναλύοντας το βαθμονομητή ορίου θετικότητας σε κάθε εξέταση εις διπλούν.
- 2) Προσδιορίστε τη μέση τιμή OD, δηλαδή την τιμή COC που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των τιμών δείκτη.
- 3) Μια τιμή δείκτη υπολογίζεται με διαίρεση της απορρόφησης δείγματος/μάρτυρα δια της τιμής του COC.

Ερμηνεία (1): Απορρόφηση

Τα δείγματα με τιμή απορρόφησης ανώτερη του COC x 1,2 θεωρούνται αντιδρώντα (θετικά) στο IgG έναντι του HHV-8.

Τα δείγματα με τιμή απορρόφησης χαμηλότερη της τιμής του COC x 0,8 θεωρούνται μη αντιδρώντα (αρνητικά) σε IgG έναντι του HHV-8.

Τα δείγματα με τιμή απορρόφησης ανώτερη ή ίση της τιμής του COC x 0,8 και χαμηλότερη ή ίση του COC x 1,2 είναι αμφισβητούμενα.

Ερμηνεία (2): Τιμή Δείκτη

Η σύγκριση δεδομένων μεταξύ διαφορετικών σειρών εξέτασης διευκολύνεται με τη χρήση μιας τιμής δείκτη με την οποία η απορρόφηση του δείγματος εκφράζεται σε σχέση με τον βαθμονομητή ορίου θετικότητας της εξέτασης. Σε αυτή την περίπτωση, μια τιμή δείκτη <0,8 ή >1,2 υποδεικνύει αρνητικότητα ή θετικότητα του δείγματος, αντίστοιχα. Αμφισβητούμενα θεωρούνται τα δείγματα εάν η τιμή δείκτη είναι μεταξύ των τιμών 0,8-1,2.

$$\text{Δείκτης} = \frac{\text{Απορρόφηση μάρτυρα/δείγματος}}{\text{Μέση απορρόφηση βαθμονομητή ορίου θετικότητας (COC)}}$$

Τα δείγματα που δεν είναι ούτε αντιδρώντα (θετικά) ούτε μη αντιδρώντα (αρνητικά) θεωρούνται αμφισβητούμενα και πρέπει να επανεξετάζονται. Εάν το αποτέλεσμα της επανεξέτασης είναι επίσης αμφισβητούμενο, πρέπει να συλλεχθεί δεύτερο δείγμα ύστερα από 7-14 ημέρες. Αμφισβητούμενο αποτέλεσμα του δεύτερου δείγματος μπορεί να θεωρηθεί το μη αντιδρόν (αρνητικό) για IgG έναντι του HHV-8, ωστόσο εάν υπάρχει υπόνοια για πρόσφατη λοίμωξη, αυτή μπορεί να επαληθευτεί εφαρμόζοντας εναλλακτική μέθοδο ανάλυσης.

Κριτήρια Ελέγχου Ποιότητας

Για τον προσδιορισμό της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων ανάλυσης πρέπει να περιλαμβάνονται πάντα ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας. Τα αποτελέσματα μιας εξέτασης θεωρούνται έγκυρα εάν πληρούνται τα κατωτέρω κριτήρια:

1. Η μέση τιμή δείκτη του θετικού μάρτυρα είναι ανώτερη ή ίση του δείκτη 1,2
2. Η μέση τιμή δείκτη του αρνητικού μάρτυρα είναι κατώτερη του δείκτη 0,8.

Εάν τα ανωτέρω κριτήρια δεν πληρούνται, η εξέταση δεν είναι έγκυρη και πρέπει να επαναλαμβάνεται.

Περιορισμοί Χρήσης

- Τα αποτελέσματα πρέπει να συσχετίζονται με τα κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του ασθενούς, καθώς και με άλλα κλινικά εργαστηριακά αποτελέσματα για τη διάγνωση της λοίμωξης από HHV-8.
- Αποτέλεσμα μη αντιδρώντος (αρνητικού) δείγματος δεν αποκλείει την πιθανότητα λοίμωξης από HHV-8. Η ανάπτυξη ανιχνεύσιμης αντίδρασης στο αντίσωμα μπορεί να προκύψει μερικές ημέρες μετά τη λοίμωξη. Εάν υπάρχει υπόνοια για λοίμωξη από HHV-8 και το αποτέλεσμα είναι αρνητικό, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί δύο εβδομάδες αργότερα.
- Τα δεδομένα που διατίθενται για την υποστήριξη της ερμηνείας των αποτελεσμάτων δοκιμών που διεξάγονται σε άλλα υγρά του σώματος ή σε αναμειγμένα δείγματα ορού/πλάσματος είναι ανεπαρκή.
- Η απόδοση της δοκιμής μπορεί να επηρεαστεί σε περίπτωση απόκλισης από τη διαδικασία, την ερμηνεία και τις συνιστώμενες προφυλάξεις.
- Η απόδοση της εξέτασης έχει επαληθευτεί βάσει διπλής ανάλυσης των μαρτύρων δοκιμής και μονής ανάλυσης των δειγμάτων.

Αναμενόμενες τιμές

Επιπολασμός του ιού

Ο επιπολασμός της νόσου προσδιορίζεται συνήθως ύστερα από εκτεταμένη ανάλυση για τα επίπεδα αντισώματος σε οποιονδήποτε δεδομένο πληθυσμό, σύμφωνα με την ηλικία, το φύλο, τη γεωγραφική θέση και την κοινωνικο-οικονομική κατάσταση.

Ο επιπολασμός του ιού HHV-8 σε δότες αίματος ποικίλλει μεταξύ 5 -10% στις Ηνωμένες Πολιτείες και τη Β. Ευρώπη⁽⁴⁾, μεταξύ 10 -35% στην Ιταλία και τις χώρες της Μεσογείου⁽⁵⁾ και σε περισσότερο από 50% σε πολλούς πληθυσμούς της Αφρικής⁽⁶⁾.

Χαρακτηριστικά Απόδοσης

Ευαισθησία και Ειδικότητα

Μια ομάδα 166 δειγμάτων αναλύθηκε για να προσδιοριστεί η ευαισθησία της εξέτασης HHV-8 IgG. Τα δείγματα που εξετάστηκαν χαρακτηρίστηκαν από κλινικά συμπτώματα που συσχετίζονται με την λοίμωξη από HHV-8 και σάρκωμα Kaposi. Αυτά τα δείγματα αναλύθηκαν, επίσης, με μέθοδο ανοσοφθορισμού (IFA) με IgG έναντι του HHV-8 και προσδιορίστηκαν ως θετικά. Μια ομάδα 114 δειγμάτων αναλύθηκε για να προσδιοριστεί η ειδικότητα της EIA με IgG έναντι του HHV-8.

114 από αυτά τα δείγματα ήταν φυσιολογικός ανθρώπινος ορός. Τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως αρνητικά με εφαρμογή διαφορετικών εξετάσεων με IgG έναντι του HHV-8, που διατίθενται στο εμπόριο.

Κατάσταση HHV-8	Θετικό	Αρνητικό	Αμφισβητούμενο	Σύνολο
Θετικό	150	2	14	166
Αρνητικό	3	106	5	114
Σύνολο	153	108	19	280

Πίνακας 1: Υπολογίστηκαν τα αποτελέσματα ευαισθησίας και ειδικότητας.

Ευαισθησία: $150/166 = 90,4\%$

Ειδικότητα: $106/114 = 93\%$

Συμφωνία: $256/280 = 91,4\%$

Ευαισθησία = $\frac{\text{Αληθώς Θετικά (TP)}}{\text{Αληθώς Θετικά (TP) + Αρνητικά + Αμφισβητούμενα}} \times 100\%$

Ευαισθησία = $(150/166) \times 100 = 90,4\%$

Ειδικότητα = $\frac{\text{Αληθώς Αρνητικά (TN)}}{\text{Αληθώς Αρνητικά (TN) + Θετικά + Αμφισβητούμενα}} \times 100\%$

Ειδικότητα = $(106/114) \times 100 = 93\%$

Επαναληψιμότητα εντός της εξέτασης

Μια σειρά δειγμάτων ορού σε επίπεδα HHV-8 IgG που κυμαίνονταν από ασθενώς αντιδρώντα έως ισχυρώς αντιδρώντα αναλύθηκαν το καθένα συνολικά είκοσι φορές. Πραγματοποιήθηκαν επαναλήψεις εξέτασης σε 3 πλάκες ELISA από 3 παρτίδες επαλήθευσης του προϊόντος αντίστοιχα. Συνοψίστηκαν οι τιμές OD που προέκυψαν και υπολογίστηκαν η μέση τιμή OD, η τυπική απόκλιση (SD) και το ποσοστό συντελεστή μεταβλητότητας (%CV). Πίνακας 2. Αυτά τα αποτελέσματα παρατίθενται ως προς τις τιμές δεικτών της εξέτασης στον Πίνακα 3.

Το ποσοστό CV που εκφράζεται ως προς το OD (δείκτες) κυμάνθηκε από 7,28% σε ισχυρώς αντιδρόν δείγμα (SR) έως 8,022% σε ασθενώς αντιδρόν δείγμα (WR).

Δείγμα	1			2			3		
	Μέση OD	SD	% CV	Μέση OD	SD	% CV	Μέση OD	SD	% CV
SR	1,384	0,101	7,280	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

Πίνακας 2: Η επαναληψιμότητα εντός της εξέτασης εκφράζεται ως προς την οπτική πυκνότητα (OD) σε 20 επαναλήψεις κάθε 3 διαφορετικών δειγμάτων ορού που εμπίπτουν σε επίπεδα HHV-8 IgG από ασθενώς αντιδρώντα έως ισχυρώς αντιδρώντα σε 3 διαφορετικές παρτίδες. SR: ισχυρώς αντιδρώντα και WR: ασθενώς αντιδρώντα.

Δείγμα	1			2			3		
	Μέση τιμή δείκτη	SD	% CV	Μέση τιμή δείκτη	SD	% CV	Μέση τιμή δείκτη	SD	% CV
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

Πίνακας 3: Η επαναληψιμότητα εντός της εξέτασης εκφράζεται ως προς τις τιμές δεικτών σε 20 επαναλήψεις κάθε 3 διαφορετικών δειγμάτων ορού που εμπίπτουν σε επίπεδα HHV-8 IgG από ασθενώς αντιδρώντα έως ισχυρώς αντιδρώντα σε τρεις διαφορετικές παρτίδες. SR: ισχυρώς αντιδρώντα και WR: ασθενώς αντιδρώντα.

Επαναληψιμότητα μεταξύ εξετάσεων

Μια σειρά δειγμάτων ορού με επίπεδα HHV-8 IgG που κυμαίνονταν από μη αντιδρώντα έως ισχυρώς αντιδρώντα αναλύθηκαν το καθένα σε 10 εξετάσεις με 3 διαφορετικούς χειριστές. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε 1 παρτίδα προϊόντων και τα αποτελέσματα συνδυάστηκαν για να προσδιορισθεί η επαναληψιμότητα μεταξύ των εξετάσεων. Κάθε δείγμα αναλύθηκε επομένως n=10 φορές. Οι τιμές OD που προέκυψαν συνοφίστηκαν και υπολογίστηκαν η μέση τιμή OD, η τυπική απόκλιση (SD) και το ποσοστό συντελεστή μεταβλητότητας (%CV). Πίνακας 4. Αυτά τα αποτελέσματα παρατίθενται ως προς τις τιμές δεικτών της εξέτασης στον Πίνακα 5.

Το ποσοστό CV που εκφράζεται ως προς το OD (δείκτες) κυμάνθηκε από 7,04% σε ισχυρώς αντιδρόν δείγμα έως 15,84 % σε ασθενώς αντιδρόν δείγμα.

Δείγμα	Μέση OD	SD	%CV	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
UR1	0,058	0,008	13,13	10
UR2	0,061	0,011	18,19	10

Πίνακας 4: Η επαναληψιμότητα μεταξύ των εξετάσεων εκφράζεται ως προς την οπτική πυκνότητα (OD) σε 10 εξετάσεις καθενός από τα 5 διαφορετικά δείγματα ορού που κυμαίνονται ως προς τα επίπεδα HHV-8 IgG από μη αντιδρώντα έως ισχυρώς αντιδρώντα. SR: ισχυρώς αντιδρόν, MR: μετρίως αντιδρόν WR: ασθενώς αντιδρόν και UN: μη αντιδρόν.

Δείγμα	Μέση τιμή δείκτη	SD	%CV	αρ
SR	8,397	0,704	8,38	10
MR	2,934	0,436	14,87	10
WR	1,879	0,323	17,21	10
UR1	0,342	0,046	13,54	10
UR2	0,361	0,064	17,83	10

Πίνακας 5: Η επαναληψιμότητα μεταξύ των εξετάσεων εκφράζεται ως προς την τιμή δείκτη για 10 εξετάσεις καθενός από τα 5 διαφορετικά δείγματα ορού που κυμαίνονται ως προς τα επίπεδα HHV-8 IgG από μη αντιδρώντα έως ισχυρώς αντιδρώντα. SR: Ισχυρώς αντιδρόν, MR: μετρίως αντιδρόν, WR: ασθενώς αντιδρόν και UR: μη αντιδρόν.

Διασταυρούμενες αντιδράσεις:

76 δείγματα ορού ελέγχθηκαν ώστε να καθοριστεί η ειδικότητα της ανοσοενζυμικής εξέτασης Biotrin HHV-8 IgG. Όλα τα δείγματα ελήφθησαν από ασθενείς που είχαν διαγνωσθεί με τις παρακάτω νόσους:

Δείγμα	Αριθμός θετικών
Ερυθρηματώδης Λύκος	0/5
Ρευματοειδής Αρθρίτιδα (RA)	0/3
Ρευματοειδής παράγοντας (RF)	0/5
Αυτοάνοσο νόσημα	1/7
Lyme IgG	0/4
EBV IgG	2/24
Rubella IgG	0/5
CMV IgG	0/5
VZV IgG	2/5
Ηπατίτιδα C	0/2
HIV	0/5
HTLV	0/2
HSV IgG	0/4

Πίνακας 6: $n = 76$ δείγματα με πιθανές διασταυρούμενες αντιδράσεις αναλύθηκαν για να προσδιοριστεί μη ειδική σύνδεση. Τα αποτελέσματα δείχνουν τον αριθμό των δειγμάτων που αναλύθηκαν και τον αριθμό των εσφαλμένα θετικών.

Σύνοψη της διαδικασίας ανοσοενζυμικής εξέτασης του ανθρώπινου ερπητοϊού-8 IgG

Διαβάστε αναλυτικά το φυλλάδιο οδηγιών του προϊόντος πριν ξεκινήσετε την εξέταση. Αυτή η σύνοψη προορίζεται μόνο για γρήγορη αναφορά.

Παρασκευάστε το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης



Αραιώστε δείγματα (1:101) σε αραιωτικό διαλύματος



Πιπετάρετε εις διπλούν 100μl (έτοιμου προς χρήση) αρνητικού μάρτυρα, βαθμονομητή ορίου θετικότητας, θετικού μάρτυρα σε βοθρία



Πιπετάρετε μία φορά 100μl παρασκευασμένων δειγμάτων στα βοθρία



Επώαστε για 30 λεπτά @ 35-39°C



Πλύνετε τις σειρές 4 φορές



Παρασκευάστε το συζευγμένο με ένζυμο αντιδραστήριο



Προσθέστε 100μl του συζευγμένου με ένζυμο IgG αντιδραστηρίου



Επώαστε για 30 λεπτά @ 35-39°C



Πλύνετε τις σειρές 4 φορές



Προσθέστε 100μl υποστρώματος TMB



Επώαστε για 30 λεπτά @ 35-39°C



Προσθέστε 100μl ανασχετικού διαλύματος



Διαβάστε σε 450nm
με ή χωρίς αναφορά στα 630nm (εάν διατίθεται)

Παραπομπές

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.

Ερμηνεία Συμβόλων

Ιατρική συσκευή για διαγνωστική χρήση *in-vitro*

IVD

Κωδικός παρτίδας

LOT

Αριθμός καταλόγου

REF

Περιορισμός θερμοκρασίας



Ημερομηνία λήξης



Κατασκευαστής



Βλαβερό κατά την κατάποση. Εάν έρθει σε επαφή με οξέα απελευθερώνει πολύ τοξικά αέρια.



Οδηγίες Χρήσης



Πρόσθετα Προϊόντα της Biotrin

Η Biotrin International προσφέρει μια μοναδική σειρά εξετάσεων για τον ανθρώπινο ερπητοϊό, κατάλληλων για εργαστηριακή διαγνωστική χρήση ρουτίνας

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



www.biotrin.com