

ČEŠTINA

Katalogové číslo: V18HHV8
Formát: 6x10 well slides
HHV-427-03



Lidský Herpes virus-8 Imunofluorescenční stanovení IgG

Imunofluorescenční metoda k detekci lytických protilátek IgG proti lidskému herpes viru-8



Obsah

Zamýšlené použití

Úvod

Principy metody

Bezpečnostní opatření

Bezpečnost

Postup

Obsah kitu

Dodané materiály

Další požadované materiály

Skladování a stabilita

Sběr a skladování vzorků

Příprava reagensů a vzorků

Pracovní postup

Interpretace výsledků

Kritéria kontroly kvality

Očekávané hodnoty

Omezení použití

Výkonové charakteristiky

Shrnutí postupu HHV-8 IgG IFA

Odkazy na literaturu

Interpretace symbolů

Další výrobky biotrinu

Zamýšlené použití

Tato nepřímá imunofluorescenční zkouška (IFA) na protilátku proti lidskému Herpesviru-8 (HHV-8) je určena pro kvalitativní a semikvantitativní stanovení protilátky IgG proti lytickým antigenům v lidském séru nebo plazmě. Detekce protilátek třídy IgG proti HHV-8 u lidí může být použita jako pomůcka k diagnostikování primární infekce nebo reaktivace/reinfekce tímto virem.

Úvod

Lidský Herpesvirus-8 (HHV-8), který je rovněž znám jako herpesvirus asociovaný s Kaposiho sarkomem (KSHV) byl objeven teprve v roce 1994, kdy Chang *et al* identifikovali dva fragmenty DNA podobné herpesviru v lézích pacienta trpícího Kaposiho sarkomem asociovaným s AIDS⁽¹⁾. Tento virus je klasifikován jako gama-herpesvirus (genus rhadinovirus) a podobá se EBV ve svém tropizmu pro B buňky a ve své schopnosti existovat v latentním stavu. V současné době existuje silná epidemiologická průkaznost kauzativní úlohy HHV-8 v patogenezi Kaposiho sarkomu (KS). HHV-8 je detekovatelný ve všech formách tohoto onemocnění: Klasický KS (řídce maligní onemocnění vyskytující se u starších mužů ve Středomoří), africký endemický KS, KS asociovaný s transplantacemi a KS asociovaný s AIDS.

V přenosu HHV-8 mezi homosexuálními muži hraje důležitou roli sexuální styk⁽²⁾. Virus HHV-8 však může být přenášen rovněž slinami a transplantovanými orgány⁽³⁾.

Séroprevalence viru HHV-8 v obecné populaci uváděná ve vědecké literatuře se pohybuje mezi 5 a 35% podle typu používaného imunologického testu a podle zkoumané geografické oblasti. V řadě uváděných studií byly pozorovány značně zvýšené titry protilátek IgG u pacientů trpících Kaposiho sarkomem, nikoliv však u normálních dárců. Séroprevalence HHV-8 je tedy odlišná od EBV, HHV-6, HHV-7, CMV nebo HSV-1, kde >80 % populace je pozitivní na protilátky proti tomuto viru.

Séroprevalence HHV-8 u dárců krve se pohybuje od 5 do 10% ve Spojených státech a v severní Evropě⁽⁴⁾, od 10 do 35% v Itálii a ve Středomořských zemích⁽⁵⁾ a dosahuje více než 50 % v mnoha Afrických populacích⁽⁶⁾.

Existuje domněnka, že prevalence protilátek proti viru HHV-8 v běžné populaci koreluje s četností výskytu Kaposiho sarkomu po transplantaci⁽⁷⁾. Rovněž byl evidován přenos od dárce alotransplantátu na příjemce. Asociace s virem HHV-8 u příjemců transplantátu vedla k doporučení, aby u dárců orgánu a příjemců byl proveden screening na protilátky proti viru HHV-8^(8,9). Ukázalo se, že výskyt HHV-8 protilátek u HIV-pozitivních pacientů předchází a predikuje výskyt Kaposiho sarkomu⁽¹⁰⁾. U této skupiny pacientů je Kaposiho sarkom nejběžněji se vyskytujícím novotvarem. HHV-8 je rovněž spojován s výskytem lymfomů v tělesných dutinách, s multicentrickou Castlemanovou chorobou, non-Hodgkinovým lymfomem a mnohočetným myelomem⁽¹¹⁾.

V současné době může být diagnóza infekce virem HHV-8 potvrzena analýzou PCR a imunologickými testy, např. IFA a ELISA. Pomocí testů PCR je však možno detekovat DNA HHV-8 v buňkách periferní krve pouze u přibližně poloviny infikovaných osob⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Jelikož systémy detekce PCR zřejmě vykazují nízkou citlivost (je-li jako šablona použita DNA z buněk periferní krve), sérologické testy se ukázaly být pro epidemiologické studie a diagnostikování infekce HHV-8 užitečnější, zvláště při detekci dřívějšího vystavení působení tohoto viru^(11,12). Sérologické studie detekovaly specifické protilátky proti HHV-8 u 80-98% HIV-pozitivních pacientů trpících Kaposiho sarkomem, u 54 -100%

HIV-pozitivních pacientů, u nichž se Kaposiho sarkom vyvinul do 5 let po odběru vzorku a u 16-56% pacientů, u nichž se Kaposiho sarkom nevyvinul. Pomocí PCR byl HHV-8 u stejných skupin detekován pouze ve 40-50%, 30% a 5-10%.

Základem kitu HHV-8 od firmy Biotrin je buněčná linie exprimující lytický antigen a umožňující detekci protilátek proti lytickým virovým proteinům.

Některá z antiherpesvirových léčiv, jako je ganciclovir, vykazují aktivitu proti HHV-8 *in vivo*; k dispozici je však dosud omezené množství klinických údajů. Bude zapotřebí dalšího klinického výzkumu na několika krevních vzorcích, aby se stanovilo zvýšení a pokles hladin protilátek proti HHV-8 a aby bylo možno uvést tuto informaci do relace s infekcí HHV-8 a s chorobnými stavy, jako je Kaposiho sarkom.

Principy metody

Systém nepřímého imunofluorescenčního testu firmy Biotrin je rychlá, jednoduchá metoda ke stanovení protilátek proti lytickým antigenům lidského herpesviru-8. Fluorescenční test na protilátky využívá nepřímé metody fluorescenčního barvení protilátek. Tento postup se provádí ve dvou základních reakčních krocích:

V prvním kroku se lidské sérum nebo plazma, které mají být testovány, uvedou do styku s fixovanými infikovanými buňkami. Protilátka, pokud je v testovaném vzorku přítomna, vytvoří v buněčném substrátu komplex s antigenem. Jestliže zkoumaný vzorek neobsahuje žádnou protilátku pro daný antigen, nevytvoří se žádný komplex a veškeré složky séra se vymyjí během cyklu promývání.

Ve druhé kroku se přidává fluoresceinem označená antilidská protilátka. Je-li protilátka proti HHV-8 přítomna (pozitivní reakce), ve fluorescenčním mikroskopu je možno pozorovat jasnou jablečně zelenou fluorescenci.

Bezpečnostní opatření

Bezpečnost

- Pouze pro použití *in vitro*.
- Tento kit může používat výlučně kvalifikovaný laboratorní personál.
- Kit obsahuje materiál lidského původu, který je považován za POTENCIÁLNĚ BIOLOGICKY NEBEZPEČNÝ MATERIÁL. Byly zkoušeny kontrolní vzorky a bylo zjištěno, že jsou negativní na HBsAg a protilátky proti HIV 1/2 a HCV. Jelikož však žádná zkušební metoda nemůže nabídnout naprostou jistotu nepřítomnosti viru, pracujte s těmito kontrolními vzorky jako s potenciálně infekčními.
- Některé reagencie obsahují Thiomersal, který může být při požití toxický.
- Vyhýbejte se kontaktu s Evansovou modří, jelikož je to potenciální karcinogen. Dojde-li k dotyku s pokožkou, omyjte povrch pokožky velkým množstvím vody.
- Některé reagencie obsahují azid sodný, který může vytvářet při styku s olověným a měděným potrubím potenciálně výbušně kovové azidy. Při likvidaci je nutno reagencie spláchnout velkým množstvím vody, aby se zabránilo tvoření azidů.
- Likvidujte veškeré klinické vzorky, infikovaný nebo potenciálně infikovaný materiál podle osvědčených laboratorních zásad. S veškerými materiály je nutno zacházet a likvidovat je jako by byly potenciálně infekční.
- Zbytky chemikálií, přípravků a součástí kitu jsou zpravidla považovány za nebezpečný odpad. Veškeré takovéto materiály je nutno likvidovat podle stanovených bezpečnostních postupů.
- Při manipulaci se vzorky a při provádění zkoušky používejte ochranný oděv, latexové rukavice na jedno použití a ochranu očí. Po skončení práce si důkladně umyjte ruce.
- Nepipetujte materiály ústy a nikdy nejezte a nepijte u laboratorního stolu.

Postup

- Nepoužívejte kit ani individuální reagencie po jejich datu expirace.
- Nesměšujte reagencie z kitů s různými čísly šarží.
- Nepoužívejte kontaminované vzorky nebo reagencie.
- Odchyly od tohoto protokolu mohou vést k mylným výsledkům.
- Provedení zkoušky mimo dané časové a teplotní rozsahy může vést k mylným výsledkům. Zkoušky prováděné mimo stanovené časové a teplotní rozsahy musejí být opakovány.
- Pro ředění koncentrovaného promývacího pufru je požadována destilovaná nebo deionizovaná voda vysoké kvality. Použití nekvalitní nebo kontaminované vody může vést k neúspěchu. Zajistěte, aby byl promývací koncentrovaný pufr důkladně promíchán.
- Vytemperujte všechny reagencie na pokojovou teplotu (20-25°C) a před použitím je dobře promíchejte.
- Nevyjímejte mikroskopická sklíčka z jejich ochranného obalu dříve, než je budete používat. Umožněte, aby se mikroskopická sklíčka vytemperovala nejdříve na pokojovou teplotu a teprve potom otevřete jejich ochranný obal, aby se tak ochránila proti kondenzaci.
- Nenechávejte po dlouhou dobu reagencie na přímém slunci a/nebo při teplotě nad 2-8°C.
- Při barvení většího množství vzorků zabraňte křížové kontaminaci mezi vzorky tím, že je oddělíte voskovou tužkou.
- Použití většího množství montovacího média může způsobit rozmazanou fluorescenci.
- Vždycky používejte pro přípravu reagií čisté skleněné nádoby, nejlépe na jedno použití.

- Je nutno dávat pozor, aby nedošlo ke kontaminaci složek, pro pipetování vzorků a složek soupravy použijte vždy novou špičku.
- Nepoškrabejte jamku špičkou pipety nebo kapátka.
- Dříve než se zkouškou začnete, je nutno vypracovat plán identifikace a distribuce.

Obsah kitu

Dodané materiály

1. Mikroskopická sklíčka s antigenem HHV-8.

SLIDE

6 sklíček x 10 jamek s lidskými lymfocyty s expresí lytických antigenů proti HHV-8 v každé jamce sklíčka. Sklíčka jsou po vyjmutí z ochranného obalu připravena k upotřebení.
2. Kontrolní vzorek HHV-8 IgG pozitivní*

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

1 x 500µl kontrolního lidského séra pozitivního na přítomnost protilátky IgG proti HHV-8. Obsahuje azid sodný. Připraven k přímému upotřebení.
3. Negativní kontrolní vzorek*:

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

1 x 500µl kontrolního lidského séra negativního na přítomnost protilátky IgG proti HHV-8. Obsahuje azid sodný. Připraven k přímému upotřebení.
4. FITC antilidský IgG konjugát*:

CONJ	IgG
-------------	------------

1 x 1,8ml kozího (inaktivovaného) antilidského IgG (těžký a lehký řetězec) konjugovaného fluoresceinem s Evansovou modří a rhodaminovými kontrastními barvivy. Obsahuje azid sodný. Připraven k přímému upotřebení.
5. Montovací média:

MM

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

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

3 sáčky. Každý balíček práškového pufru s hliníkovým uzávěrem slouží k přípravě jednoho litru 1x promývacího pufru.
7. Savé papíry (blottery) na sklíčka

BLT

Absorbentní savé papíry mají předem připravené otvory na sušení masky podložního sklíčka mikroskopu.
8. Návod k použití:



*Potenciálně biologicky nebezpečný

Další požadované materiály

- Vysoce kvalitní destilovaná nebo deionizovaná voda.
- Přesné 20 μ l, 100 μ l a 200 μ l pipety a špičky na jedno použití.
- Vybavení na sběr séra.
- Časovací zařízení.
- Stříčka a vanička na promývání.
- Zkumavky, laboratorní stojánky, pipety, mikrotitrační destičky a bezpečnostní pipetovací zařízení na přípravu roztoků vzorků.
- Inkubátor 37°C.
- Vlhká komůrka na inkubování podložních sklíček.
- Držák na podložní sklíčka mikroskopu a barvicí miska na mytí sklíček
- Mikroskopická krycí sklíčka Sklo 22x50mm tloušťka čís. 1.
- Fluorescenční mikroskop Pro kalibrování kontrolních vzorků a konjugátu byl použit fluorescenční mikroskop s následujícím vybavením:
 - 10x okulár.
 - Objektivy 16x nebo 40x.
 - Epi-iluminátor s 50 W halogenovou žárovkou.
 - FITC excitační filtr KP490.
 - Filtr K530 pohlcující žlutou.
 - Filtr BG38 potlačující červenou.

Fluoresceinový štítek má budicí pík 490nm a emisní pík 520nm. Rozdíly v konečné reaktivitě a intenzitách fluorescence mohou být způsobeny typem a stavem fluorescenčního zařízení, které se ve vaší laboratoři používá.

Skladování a stabilita

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

Sběr a skladování vzorků

- Vzorky je nutno získat za použití aseptických laboratorních technik. Vzorky mohou být skladovány až po dobu 1 týdne při teplotě 2-8°C a při teplotě -20°C po delší dobu. Je nutno se vyhnout opětovnému zmražení a rozmražení.
- Párové vzorky séra a plazmy odebírané po určité časové období, aby se prokázala sérokonverze nebo signifikantní zvýšení titru musí jí být odebrány s maximálním časovým rozdílem 7-14 dní a musí být skladovány při teplotě -20°C. Tyto vzorky je nutno testovat současně.

Příprava reagensí a vzorků

Příprava reagensí

Promývací pufr: Přidejte celý obsah balíčku PBS do 1 litru čerstvě připravené destilované nebo deionizované vody. Skladujte v čisté uzavřené nádobě při teplotě 2-8°C po dobu až 4 týdnů.

Poznámka: Rozpustnost se usnadní, přidají-li se soli za rychlého míchání vody. Všechny ostatní reagensie se dodávají hotové a připravené k upotřebení a v pracovním zředění.

Příprava vzorku

Kvalitativní test: Nařed'te vzorek promývacím pufrem v poměru 1:64. Připravte všechny roztoky v minimálním objemu 100µl promývacího pufru.

Kvantitativní test „Titr“ vzorku je možno stanovit tak, že se vzorek sériově ředí (koeficient ředění 2) promývacím pufrem, přičemž se započne se zředěním 1:64 a pro každé následné zředění se vždy smíchá stejný objem zředěného vzorku a promývacího pufru, ředění se provádí dokud není dosaženo fluorescence stupně „+1“ (viz „Interpretace výsledků“).

Pracovní postup

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

1. Příprava podložních sklíček

Vyjměte požadovaný počet podložních sklíček z ochranného obalu a označte místa mezi jamkami voskovou tužkou, aby se tak zabránilo kontaminaci. Kápněte 1 kapku (přibližně 20µl) každého rozředěného testovaného vzorku a 1 kapku (přibližně 20µl) pozitivního a negativního kontrolního vzorku a 1 kapku promývacího pufru do očíslovaných jamek.

Poznámka: Dodejte dostatečné množství, aby se každá jamka naplnila, nedopusťte však smíchání obsahu mezi jednotlivými jamkami.

2. Vzorky inkubujte

Inkubujte sklíčka ve vlhké komoře po dobu 30 minut při teplotě 35-39°C.

3. Umyjte podložní sklíčka

Opláchněte podložní sklíčka podél okraje slabým proudem promývacího pufru za použití stříčky. Proud nesměrujte na jamky. Vložte sklíčka do promývací misky obsahující promývací pufr na dobu 10 minut při pokojové teplotě (20-25°C) a po 5 minutách vyměňte roztok promývacího pufru jemným potřepáváním. Osušte barevnou masku kolem zkušebních jamek dodanými savými papíry.

4. Inkubujte s konjugátem

Kápněte 1 kapku (přibližně 20µl) konjugátu připraveného k upotřebení do každé z testovacích jamek. Inkubujte sklíčka ve vlhké komoře po dobu 30 minut při teplotě 35-39°C.

5. Umyjte podložní sklíčka

Opakujte Krok 3.

6. Aplikujte montovací médium

Aplikujte 1 malou kapku montovacího média do středu každé jamky a přiložte krycí sklíčko.

7. Prohlédněte sklíčko

Pohlédněte je ve fluorescenčním mikroskopu při zvětšení 200-500x. Nejlepších výsledků se dosáhne, prohlédnete-li sklíčka okamžitě po ukončení testu. (Abyste dosáhli ekvivalentních výsledků, sklíčka zabalte nebo je udržujte zvlhčená, abyste tak minimalizovali vyschnutí montovacího média. Skladujte v temnu při teplotě 2-8°C. Odečtete do 3 dnů.)

8. Klasifikace

Pozitivní reaktivita se může pohybovat ve fluorescenční intenzitě od brilantní po slabou. Klasifikujte fluorescenční reakci podle následující stupnice intenzity:

+4 (brilantní), +3 (jasná), +2 (mírná), +1 (slabá).

Interpretace výsledků

Negativní reakce:

Vzorek se považuje za negativní na přítomnost protilátky IgG proti viru HHV-8, jestliže je nepřítomno fluorescenční zbarvení infikovaných buněk.

Pozitivní reakce:

- V případě lytického antigenu bude fluoreskovat celá buňka, jak cytoplazma, tak i jádro.
- Vzorek může být považován za HHV-8 IgG pozitivní, jestliže je přítomno zelené fluorescenční zbarvení infikovaných buněk při zředění $\geq 1:64$ a fluorescenční obraz je podobný jako u pozitivního kontrolního vorku. Temně zelené buňky, které nemají vzhled podobný pozitivnímu kontrolnímu vzorku jsou klasifikovány jako negativní.

+4 = brilantní zelená fluorescence indikuje velmi vysoký titr protilátek IgG proti HHV-8.

+3 = jasná zelená fluorescence indikuje vysoký titr protilátek IgG proti HHV-8.

+2 = zelená fluorescence indikuje střední titr protilátek IgG proti HHV-8.

+1 = matně zelená fluorescence indikuje slabý titr protilátek IgG proti HHV-8. Rovněž indikuje konečné ředění daného vzorku.

- Titrace HHV-8 IgG pozitivních vzorků poskytuje kvantitativní informace. V řadě titrací se nejvyšší rozředění séra vykazující reakci „+1“ interpretuje jako konečný titr.
- Aby se zajistila interní kontrola, každá jamka na mikroskopickém sklíčku obsahuje jak buňky infikované HHV-8, tak i buňky neinfikované. Příprava mikroskopického sklíčka tímto způsobem je záměrná. Neinfikované buňky zbarvené kontrastním barvivem červeně poskytují kontrastní pozadí.

Význam interpretace

U skriningového zředění není zjištěna žádná rozeznatelná fluorescence infikovaných buněk.	Testovaný vzorek je negativní na protilátky IgG proti HHV-8.
Nahodile zelené buňky neukazující žádnou rozeznatelnou fluorescenci infikovaných buněk.	Testovaný vzorek je negativní na protilátky IgG proti HHV-8.
Infikované buňky, které nejsou klasifikovány alespoň reakcí 1+	Testovaný vzorek je nereaktivní a považuje se za negativní na protilátky IgG proti viru HHV-8.
U kontrolního zředění nebo při vyšším zředění byla zjištěna specifická pozitivní fluorescence infikovaných buněk.	Testovaný vzorek je pozitivní na přítomnost protilátek třídy IgG proti HHV-8, což indikuje dřívější infekci HHV-8. Sérokonverze nebo čtyřnásobně a větší zvýšení titru protilátek IgG v párových sérových vzorcích indikuje nedávnou infekci virem HHV-8.
Zjištěná fluorescence jak u infikovaných tak i neinfikovaných buněk	Testovaný vzorek vykazuje nespecifickou reakci.

Kritéria kontroly kvality

Každá zkouška musí zahrnovat pozitivní kontrolní vzorek, negativní kontrolní vzorek a prázdnou jamku obsahující pouze promývací pufr. Výsledky zkoušky jsou považovány za validní, jsou-li splněna následující kritéria:

1. HHV-8 IgG pozitivní kontrolní vzorek dodaný s tímto kitem dává intenzitu fluorescence $\geq +2$.
2. HHV-8 IgG negativní kontrolní vzorek dodaný s tímto kitem nedává žádnou viditelnou fluorescenci.
3. Jamka obsahující pouze promývací pufr nedává žádnou viditelnou fluorescenci.

Poznámka: Jamka obsahující pouze promývací pufr funguje jako kontrola konjugátu, aby se zajistilo, že konjugát nereaguje s buněčným substrátem.

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

Očekávané hodnoty

Séroprevalence

Prevalence choroby se zpravidla určuje po rozsáhlém provádění testů na hladiny protilátek u každé dané populace podle věku, pohlaví, geografické oblasti a socio-ekonomického statutu.

Séroprevalence HHV-8 u dárců krve se pohybuje od 5 do 10% ve Spojených státech a v severní Evropě⁽⁴⁾, od 10 do 35% v Itálii a ve Středomořských zemích⁽⁵⁾ a dosahuje více než 50% v mnoha Afrických populacích⁽⁶⁾.

Omezení použití

- Serologický test jako IFA slouží jako pomůcka k detekci virové infekce, jeho použití by však nemělo být jediným kritériem. Výsledky testu by měly být porovnány s pacientovým klinickým a epidemiologickým profilem a s dalšími klinickými laboratorními výsledky.
- Jediný pozitivní výsledek testu na protilátku IgG proti HHV-8 je signifikantní pouze v tom, že indikuje dřívější kontakt nebo infekci tímto virem. Jediný výsledek je užitečný pro epidemiologické účely. Nesmí se však používat jako indikace současné nebo nedávné infekce tímto virem. Aby se stanovila současná nebo nedávná infekce, je nutno provést současné testování párových vzorků séra odebraných v rozmezí 7-14 dní. Čtyřnásobné nebo vyšší zvýšení titru mezi prvním a druhým vzorkem je indikací současné nebo nedávné infekce.
- Ve studii firmy Biotrin byly zjištěny nespecifické pozitivní reakce u vzorků od pacientů s jistými autoimunními chorobami jako je přítomnost protilátek proti buněčným jádrům vlastních buněk (ANA) Jak infikované tak i neinfikované buňky budou fluoreskovat, což může pozitivní HHV-8 reakci překrýt. Zpozorování autoimunní reakce nemůže tedy vyloučit možnost infekce HHV-8. Při zkoušce na lytické protilátky existuje možnost, že pozitivní ANA reakce bude interpretována jako pozitivní. Aby se falešné pozitivní nálezy vyloučily, může napomoci srovnání údajů ze vzorku obsahujícího ANA (protilátky proti buněčným jádrům vlastních buněk) s korpuskulární reakcí pozitivního kontrolního vzorku.

Výkonové charakteristiky

Sensitivita a specificita

Diagnostická sensitivita

Bylo vzato 33 vzorků ze známé skupiny pozitivních vzorků a testováno na protilátky IgG proti HHV-8 pomocí testu Biotrin HHV-8 IgG IFA. Uvedených 33 vzorků bylo testováno pozitivně a vykazovaly 100% sensitivitu. Uvedená skupina pozitivních vzorků byla ověřena jinou na trhu dostupnou zkouškou.

$\% \text{ sensitivitu} = \frac{\text{skutečně pozitivní}}{\text{skutečně pozitivní} + \text{falešně pozitivní} + \text{dvojnásobné}} \times 100$

$\% \text{ sensitivitu} = \frac{33}{(33 + 0)} \times 100 = 100 \%$

$\% \text{ sensitivitu} = 100\%$

Diagnostická specifická

Specifická testu Biotrin HHV-8 IgG IFA byla vyhodnocena testováním 122 negativních vzorků. Tyto vzorky byly potvrzeny jako negativní pomocí Biotrin HHV-8 IgG IFA a dvěma dalšími na trhu dostupnými zkouškami na základě pravidla dva ze tří. Z těchto 122 vzorků bylo 114 negativních a 8 pozitivních. Na základě následující rovnice se zjistila 94% specifická:

$$\% \text{ specifická} = \frac{\text{skutečně negativní}}{(\text{skutečně negativní} + \text{falešně pozitivní} + \text{dvojnásobné})} \times 100$$

$$\% \text{ specifická} = \frac{114}{(114 + 8)} \times 100 = 94 \%$$

$$\% \text{ specifická} = 94 \%$$

Křížová reaktivita

Bylo testováno 42 vzorků séra, aby se stanovila specifická testu Biotrin HHV-8 IgG IFA. V následující tabulce jsou shrnuty výsledky vzorků séra odebraného od pacientů s těmito chorobami:

Tabulka 1:

Virus	Biotrin's HHV- 8 IgG IFA
Lymfický	0/3
Lidský T-buněčný lymfotropní virus (HTLV)	0/2
Protilátky proti buněčným jádrům vlastních buněk (ANA) ¹	3/3
HHV6 IgG	0/3
HIV-1	0/9
Hepatitidy C	0/2
Hepatitidy B	0/2
Cytomegalovirus (CMV IgG)	0/4
Virus Epstein-Barrové (EBV)	0/2
Virus herpesu simplexu (HSV)	0/3
Virus varicella-zoster (VZV)	0/2

¹ Reaguje křížově (viz Omezení použití)

Interference (Analytická specifická)

Zkoumání interference zahrnovalo testy na hemolýzu, bilirubiny a revmatoidní faktor. Byla pozorována jistá nespecifická fluorescence. Ta však neinterferuje s pozitivní interpretací intenzity fluorescence. Na všech zabarvených sklíčkách bylo pozorováno cihlově červené kontrastní zabarvení.

Reprodukovatelnost

Intra-testová reprodukovatelnost

Kontrolní séra obsažená v kitu, vzorek promývacího pufu, patientské vzorky s vysokým a středním titrem IgG byly v tentýž den 20krát testovány na soupravách 3 různých výrobních šaržích. Byly získány následující výsledky:

Tabulka 2:

Kontrolní vzorky	Šarže 1	Šarže 2	Šarže 3
PKV	3+/4+	3+-4+	4+
NKV	0	0	0
Promývací pufr:	0	0	0
Vysoký	Šarže 1	Šarže 2	Šarže 3
1	3+/4+	3+/4+	3+/4+
2	3+	3+/4+	4+
3	3+/4+	3+	4+
4	3+	3+	4+
5	3+/4+	3+	4+
6	3+	3+	4+
7	3+	3+	4+
8	3+	3+/4+	4+
9	3+	3+	4+
10	3+	3+/4+	3+/4+
11	3+	3+	4+
12	3+	3+/4+	3+/4+
13	3+	3+	4+
14	3+	3+	4+
15	3+	3+	4+
16	3+	3+	4+
17	3+	3+	4+
18	3+	3+/4+	3+/4+
19	3+	3+/4+	4+
20	3+/4+	3+/4+	3+/4+
STŘEDNÍ	Šarže 1	Šarže 2	Šarže 3
1	2+	2+	2+/3+
2	1+/2+	2+	2+
3	2+	2+	2+/3+
4	2+	2+	2+
5	1+/2+	2+	2+
6	2+	2+/3+	2+
7	2+	2+	2+
8	2+	2+	2+/3+
9	1+/2+	2+	2+/3+
10	2+	2+	2+3+
11	2+	2+	2+
12	2+	2+	2+
13	1+/2+	2+	2+
14	1+/2+	2+	2+
15	1+	2+	2+
16	2+	2+	2+3+
17	2+	2+	2+
18	1+/2+	2+	2+/3+
19	2+	2+	2+/3+
20	2+	2+	2+

Inter-testová reprodukovatelnost

Kontrolní séra obsažená v kitu, vzorek promývacího pufru, patientské vzorky s nízkým, vysokým a středním titrem IgG byly v různé dny testovány na soupravách 10 různých výrobních šaržích. Byly získány následující výsledky:

Tabulka 3a**Šarže 1**

Vzorky	Zkouška 1	Zkouška 2	Zkouška 3	Zkouška 4	Zkouška 5	Zkouška 6	Zkouška a 7	Zkouška 8	Zkouška 9	Zkouška 10
PKV	3+/4+	3+	3+/4+	3+	3+	3+	3+/4+	3+/4+	4+	3+/4+
NKV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Promývací pufr:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vysoký	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
Vysoký	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+	4+	3+/4+
Střední	1+/2+	2+	2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	2+	1+	1+/2+	1+
Střední	1+	1+	1+/2+	1+	1+	1+/2+	2+	1+	2+	1+
PKV 1:256*	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
Negativní	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativní	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabulka 3b**Šarže 2**

Vzorky	Zkouška 1	Zkouška 2	Zkouška a 3	Zkouška a 4	Zkouška 5	Zkouška 6	Zkouška a 7	Zkouška 8	Zkouška 9	Zkouška 10
PKV	4+	3+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+	3+	3+	3+/4+
NKV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Promývací pufr:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vysoký	3+/4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
Vysoký	4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+
Střední	2+	2+	1+/2+	2+	2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	2+
Střední	1+	1+	1+	1+/2+	1+	1+/2+	1+	1+	1+/2+	1+/2+
PKV 1:256*	1+/2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+/2+
Negativní	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativní	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabulka 3c**Šarže 3**

Vzorky	Zkouška 1	Zkouška 2	Zkouška 3	Zkouška 4	Zkouška 5	Zkouška 6	Zkouška 7	Zkouška 8	Zkouška 9	Zkouška 10
PKV	3+	3+	3+/4+	4+	3+/4+	4+	3+/4+	3+/4+	4+	3+
NKV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Promývací pufr:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vysoký	3+	3+	3+	4+	2+/3+	3+	2+/3+	3+	3+	2+/3+
Vysoký	4+	3+/4+	3+/4+	4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+
Střední	1+	1+	1+/2+	2+/3+	1+/2+	1+/2+	2+	1+/2+	2+	1+
Střední	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+/2+	1+	1+
PKV 1:256*	2+	1+/2+	1+/2+	2+	2+	1+/2+	1+	2+	2+	1+
Negativní	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativní	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*Byl zahrnut titr pozitivního kontrolního vzorku při zředění 1:256 v promývacím pufru

Shrnutí postupu HHV-8 IgG IFA

Důležitá poznámka:

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

Kvalitativní stanovení: Vzorek zřed'te promývacím pufrem v poměru 1:64.

Kvantitativní titrace: Začněte roztokem vzorku zředěným promývacím pufrem v poměru 1:64 , při dalším sériovém ředění smíchejte vždy stejný objem zředěného vzorku a promývacího pufru.



Přidejte ~20 μ l pozitivního kontrolního vzorku do jamky čís. 1 podložního sklíčka
Přidejte ~20 μ l negativního kontrolního vzorku do jamky čís. 2 podložního sklíčka
Přidejte ~20 μ l promývacího pufru do jamky čís. 3 podložního sklíčka
Přidejte ~20 μ l rozředěného vzorku do zbývajících jamek (jeden vzorek na jamku)



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



Umyjte sklíčko promývacím pufrem



Přidejte ~20 μ l (1 kapku) konjugátu do každé jamky



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



Umyjte sklíčko promývacím pufrem



Do každé jamky dejte 10 μ l montovacího média a přiložte krycí sklíčko



Prohlédněte sklíčko ve fluorescenčním mikroskopu

Odkazy na literaturu

1. Chang Y. *et al*/ Science 265:1865-1869, 1994.
2. Dukers *et al.*: Risk factors for Human Herpesvirus-8 seropositivity and seroconversion in a cohort of homosexual men. American J of Epidemiology 2000; 151, 213-24.
3. T. F Schulz: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (Human Herpesvirus-8): epidemiology and pathogenesis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2000; 45, Topic T3, 15-27.
4. Gao SJ *et al.*: KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. Natl Med 1996; 2:925-8.
5. Whitby D *et al.*: Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy. J Natl Cancer Inst 1998:90:395-7.
6. Sitas F *et al.*: Antibodies against human herpesvirus-8 in black South African patients with Cancer. N Engl J of Medicine 1999; 340:1863-71.
7. Francis C: Kaposi's sarcoma after renal transplantation. Nephrol Dial Transport 1998; 13:2768-2773.
8. Frances C *et al.*: Outcome of kidney transplant recipients with previous human herpesvirus-8 infection. Transplantation 2000; 69(9) 1776-1779.
9. J.P. Allain: Emerging viral infections relevant to transfusion medicine. Blood Review 2000; 14, 173-181.
10. Gao *et al.*: Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. N Engl J of Med 1996; 335:233-41.
11. Cesarman E, Knowles, D.M.: The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV / HHV-8) in lymphoproliferative diseases. Cancer Biology 1999:9, 165-174.
12. Smith M.S. *et al.*: 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. J of Infect Dis 1997; 176:84-93.
13. Spira TJ *et al.*: Comparison of serological assays and PCR for Diagnosis of Human herpesvirus 8 infection. J of Clinical Microbiology 2000; 38 (6): 2174-2180.
14. Antman K: Kaposi's sarcoma. Medical Progress 2000; 342; 14 1027-1037.

Interpretace symbolů

Diagnostický *in-vitro* zdravotnický prostředek



Kód šarže



Katalogové číslo



Teplotní omezení



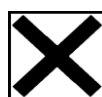
Upotřebit do konce



Výrobce



Při požití škodlivý. Při kontaktu s kyselinami uvolňuje velmi toxické plyny.



Instrukce k použití:



Další výrobky biotrinu

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

Catalogue Number:	Product	Number of tests
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 plate EIA
V18HHV8	Human Herpesvirus-8 IgG IFA	6 X 10 well slides
V19HHV8	Human Herpesvirus-8 IgG EIA	96 well plate 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