

HHV-8 IgG IFA, Kat-Nr.: V18HHV8, HHV-427-03 07/09, DE



DEUTSCH

Katalog-Nr.:V18HHV8
Kit-Format: 6x10 well slides
HHV-427-03



Humanes Herpesvirus 8 IgG Immunfluoreszenztest

Indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das Humane Herpesvirus-8 (HHV-8)



Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck

Einleitung

Testprinzip

Vorsichtsmaßnahmen

Sicherheit

Allgemeines zur Testdurchführung

Bestandteile des Kits

Mitgelieferte Materialien

Zusätzlich benötigte Materialien

Lagerung und Stabilität

Probenentnahme und Lagerung

Vorbereitung der Reagenzien und Proben

Testdurchführung

Interpretation der Ergebnisse

Qualitätskontrollkriterien

Referenzwerte

Limitationen des Tests

Leistungsdaten des Tests

Zusammenfassung des HHV-8 IFT

Literatur

Erläuterung der Symbole

Weitere Produkte von Biotrin

Verwendungszweck

Der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das humane Herpesvirus-8 (HHV-8) dient der qualitativen und semiquantitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen HHV-8-Antigene in humanem Serum oder Plasma. Der Test kann bei der Diagnose einer Primärinfektion oder erneuten Infektion bzw. Reaktivierung des Virus helfen.

Einleitung

Das humane Herpes Virus-8 (HHV-8), auch Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV) oder Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSAH), wurde erstmals 1994 von Chang et al. in zwei Herpesvirus-ähnlichen DNA-Sequenzen nachgewiesen, die aus Läsionen eines Patienten mit AIDS-assoziiertem Kaposi-Sarkom stammten⁽¹⁾. HHV-8 gehört zu den Gamma-Herpesviren (Genus Rhadinovirus) und ähnelt in seinem Tropismus für B-Zellen sowie seiner Latenz-Fähigkeit dem EBV. Aus epidemiologischer Sicht gibt es zwar keinen Beweis dafür, dass HHV-8 ursächlich an der Pathogenese des Kaposi-Sarkoms (KS) beteiligt ist, das Virus ist aber bei allen KS-Krankheitsformen nachweisbar: Bei klassischem KS (einer seltenen bösartigen Erkrankung, die vorrangig bei älteren Männern im Mittelmeerraum auftritt), Afrika-endemischem KS (Lymphadenopathie-assoziiertem KS), Transplantation-assoziiertem KS und AIDS assoziiertem KS.

Bei der Virusausbreitung spielt die sexuelle Übertragung speziell bei Homosexuellen eine wichtige Rolle⁽²⁾, HHV-8 kann aber auch durch Speichel und bei Organtransplantationen übertragen werden⁽³⁾.

Die Durchseuchungsrate der Allgemeinbevölkerung mit HHV-8 wird in der Fachliteratur, je nach Testverfahren und Region, mit 5 - 35% angegeben. In manchen Studien wurden stark erhöhte IgG-Antikörpertiter bei KS-Patienten, nicht aber bei gesunden Spendern, beschrieben. Demzufolge unterscheidet sich die HHV-8-Durchseuchungsrate von derjenigen anderer Herpesviren wie EBV, HHV-6, HHV-7, CMV oder HSV-1, für die jeweils mehr als 80% der Bevölkerung seropositiv sind.

Die Durchseuchungsrate 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⁾.

Die Prävalenz von HHV-8-Antikörpern in der Allgemeinbevölkerung scheint mit der Häufigkeit einer KS-Entwicklung nach Transplantation zu korrelieren⁽⁷⁾. Auch eine Übertragung durch das allogene Transplantat von Spender zum Empfänger wurde beschrieben. Diese Verbindung zwischen HHV-8-Nachweis und Transplantatempfängern hat dazu geführt, dass sowohl für Organspender als auch Organempfänger eine Untersuchung auf HHV-8-Antikörper empfohlen wird^(8,9). Bei HIV-positiven Patienten ließen sich HHV-8-Antikörper vor Entwicklung des KS nachweisen und kündigten es quasi an⁽¹⁰⁾. Ein KS ist das häufigste Neoplasma in dieser Patientengruppe. HHV-8 wurde auch mit Körperhöhlenlymphomen, auch als primäre Effusionslymphome bezeichnet, Castleman-Tumor, Non-Hodgkin-Lymphom und Multiplem Myelom in Zusammenhang gebracht⁽¹¹⁾.

Zur Zeit kann eine Diagnose auf HHV-8-Infektion durch PCR-Analysen und immunologische Tests wie IFT und ELISA bestätigt werden. Mit Standard-PCR-Tests lässt sich jedoch nur bei etwa der Hälfte der infizierten Patienten in peripheren Blutzellen HHV-8-DNA nachweisen⁽¹²⁻¹⁴⁾.

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^(11,12). In serologischen Studien ließen sich bei 80 - 97% HIV-positiver Patienten mit KS spezifische HHV-8-Antikörper nachweisen, bei 54 - 100% der HIV-positiven Patienten, die innerhalb von 5 Jahren nach Probennahme ein KS entwickelten und bei

16 - 56% der Patienten, die kein KS entwickelten⁽¹³⁾. Im Gegensatz dazu lagen die entsprechenden Prozentzahlen beim HHV-8-Nachweis mittels PCR in den gleichen Patientengruppen bei nur 40 - 50%, 30% und 5-10%.

Der HHV-8-Kit von Biotrin verwendet eine Zelllinie, die lytische Antigene exprimiert und den Nachweis von Antikörpern gegen lytische virale Proteine ermöglicht.

Einige gegen Herpesviren gerichtete Medikamente wie z.B. Gancyclovir zeigten sich *in vivo* gegenüber HHV-8 reaktiv, aber hierzu gibt es bislang nur wenige klinische Daten. Weitere klinische Forschung ist erforderlich, um den Anstieg und Abfall der Antikörperspiegel bei HHV-8 zu definieren und diese mit einer HHV-8-Infektion und KS-entsprechenden Krankheitsstadien in Beziehung setzen zu können.

Testprinzip

Der indirekte Immunfluoreszenztest von Biotrin ist eine schnelle, einfach durchzuführende und empfindliche Methode zur Bestimmung von Antikörpern gegen lytische Antigene des humanen Herpesvirus vom Typ 8, dem eine indirekte Methode zur Fluoreszenzfärbung von Antikörpern zugrunde liegt. Das Verfahren beruht auf zwei grundlegenden Reaktionsschritten:

Im ersten Schritt wird das zu testende Humanserum oder -plasma mit fixierten infizierten Zellen in Kontakt gebracht. Enthält die Probe Antikörper gegen HHV-8, bilden diese mit den Antigenen auf den Zellen Komplexe. Sind in der zu untersuchenden Probe keine spezifischen Antikörper vorhanden, bilden sich auch keine Komplexe und alle Serumkomponenten werden in dem anschließenden Waschzyklus wieder entfernt.

Im zweiten Schritt werden Fluorescein-markierte anti-human-Antikörper zugegeben, die im Falle einer positiven Probe (Komplexbildung zwischen anti-HHV-8-Antikörpern und den Antigenen auf den fixierten Zellen) eine leuchtend apfelgrüne Fluoreszenz auslösen, die mit einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden kann.

Vorsichtsmaßnahmen

Sicherheit

- Nur zum *in vitro*-Gebrauch.
- Dieser Test darf nur von qualifiziertem Laborpersonal durchgeführt werden.
- Der Testkit enthält Material humanen Ursprungs, das als POTENZIELL BIOLOGISCH GEFÄHRLICHES MATERIAL anzusehen ist. Die Kontrollen wurden zwar auf HBsAg und Antikörper gegen HIV 1/2 und HCV getestet und negativ befundet, da jedoch mit keinem Testverfahren die Anwesenheit von Infektionserregern mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden kann, müssen alle Kontrollen als potenziell infektiös gehandhabt werden.
- Einige Reagenzien enthalten Thiomersal, das bei Inkorporation Vergiftungen hervorrufen kann.
- Evans-Blau gilt als potenziell karzinogen. Jegliche Berührung vermeiden, bei Hautkontakt großzügig mit Wasser spülen.
- Einige Reagenzien enthalten Natriumazid, das mit Blei- und Kupferrohrleitungen explosive Salze bilden kann. Bei der Beseitigung flüssiger Azidabfälle sollte deshalb mit viel Wasser nachgespült werden.
- Alle klinischen Proben, infiziertes oder potenziell infiziertes Material sollten nach den Regeln der "Guten Laborpraxis" (GLP) beseitigt werden. Sie sind alle als potenziell infektiös zu handhaben und zu entsorgen.
- Reste an Chemikalien oder an Präparations- bzw. Kitbestandteilen werden grundsätzlich als gefährlicher Abfall angesehen. Alle derartigen Materialien sollten in Übereinstimmung mit den geltenden Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.
- Während der Handhabung der Proben und der Durchführung des Tests müssen Schutzkleidung, Einweg-Latexhandschuhe und Schutzbrille getragen werden. Nach der Testdurchführung gründlich die Hände waschen.
- Niemals mit dem Mund pipettieren. Essen und Trinken ist in Laborräumen nicht gestattet.

Allgemeines zur Testdurchführung

- Den Kit oder einzelne Reagenzien nicht nach Ablauf des angegebenen Verfallsdatums verwenden.
- Die aktiven Komponenten einer Charge dieses Kits sind als Einheit optimiert. Keine Komponenten mit Komponenten anderer Chargen oder anderer Quellen mischen.
- Keine kontaminierten Proben oder Reagenzien in den Test einsetzen.
- Abweichungen vom mitgelieferten Protokoll zur Testdurchführung können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Wird der Test nicht entsprechend den vorgegebenen Zeit- und Temperaturbedingungen durchgeführt, können die Ergebnisse ungültig sein. Alle Tests, die nicht den Vorgaben entsprechen, müssen wiederholt werden.
- Zur Rekonstitution des Waschpufferkonzentrats wird destilliertes oder deionisiertes Wasser hoher Qualität benötigt. Wasser minderer Qualität oder kontaminiertes Wasser kann zu erhöhten Hintergrundwerten führen. Das Waschpufferkonzentrat muss vor der Rekonstitution gut durchmischt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (+20 bis +25°C) gebracht und gut gemischt werden.
- Die Objektträger bis zum tatsächlichen Gebrauch im Schutzbeutel belassen. Lassen Sie den Beutel vor der Entnahme der Objektträger erst auf Raumtemperatur kommen, um den Inhalt vor Kondensation zu schützen.
- Reagenzien dürfen nicht für einen längeren Zeitraum direktem Sonnenlicht ausgesetzt oder bei Temperaturen über +2 bis +8°C aufbewahrt werden.
- Werden mehrere Proben auf demselben Objektträger angefärbt, müssen Kreuzkontaminationen vermieden werden. Dies lässt sich erreichen, indem die einzelnen Auftragsstellen mit einem Wachsstift voneinander abgetrennt werden.
- Wird zuviel Einbettungsmedium aufgetragen, kann dies zu undeutlichen Fluoreszenzbildern führen.
- Immer saubere Glas- oder Einmalgeräte für die Reagenzienvorbereitung benutzen.
- Jegliche Kontamination muss mit äußerster Vorsicht vermieden und für jede Probe und Komponente eine frische Pipettenspitze verwendet werden.
- Die Auftragsstelle darf weder mit einer Pipettenspitze noch einer Tropfflasche zerkratzt werden.
- Vor der Testdurchführung sollte ein genauer Pipettierplan mit Schema erstellt werden.

Bestandteile des Kits

Mitgelieferte Materialien

1. Objektträger mit HHV-8 infizierten Zellen:

SLIDE

6 Objektträger mit je 10 Auftragsstellen, die mit humanen Lymphozyten, die lytische HHV-8-Antigene exprimieren, beschichtet sind. Die Objektträgern sind nach Entnahme aus dem Schutzbeutel gebrauchsfertig.
2. HHV-8-IgG-Positivkontrolle*:

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

Ein Fläschchen mit 500µl Humanserum mit IgG-Antikörpern gegen HHV-8. Enthält Natriumazid. Gebrauchsfertig.
3. Negativkontrolle*:

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

Ein Fläschchen mit 500µl HHV-8-negativem Humanserum. Enthält Natriumazid. Gebrauchsfertig.

4. FITC Anti-Human-IgG-Konjugat**:

CONJ	IgG	1x
------	-----	----

Ein Fläschchen mit 1,8ml Fluorescein-konjugierten Ziege-anti-Mensch-IgG- Antikörpern (inaktiviert, schwere und leichte Kette); Gegenfärbung mit Evans-Blau und Rhodamin. Enthält Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5. Einbettungsmedium:

MM

Ein Fläschchen mit 2 ml Tris-gepuffertem Glycerinpuffer. Enthält Thiomersal (0,01%). Gebrauchsfertig.

6. Waschpufferkonzentrat (PBS):

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

3 Beutel. Jeder in Aluminiumfolie versiegelte Beutel enthält in pulverisierter Form die Menge für einen Liter 1X Waschpuffer.

7. Saugpapier für Objektträger:

BLT

Im Saugpapier zum Trocknen der Objektträger sind die Löcher für die 10 Auftragsstellen vorgestanzt.

8. Arbeitsanleitung:



*Potenziell Biogefährlich

Zusätzlich benötigte Materialien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser hoher Qualität.
- Pipetten mit Einmalspitzen zum exakten Pipettieren von 20µl, 100µl und 200µl.
- Technische Ausstattung zur Serumgewinnung.
- Stoppuhr.
- Waschflaschen und Waschtrog.
- Reagenzgläser und Reagenzglasständer, Pipetten, MikroTestplatten und Pipettierhilfen für die Probenverdünnungen.
- 37°C-Brutschrank.
- Feuchte Kammer für die Inkubation der Objektträger.
- Objektträger-Ständer und Färbeschale zum Waschen der Objektträger.
- Deckgläschen: 22 X 50mm, Glasdicke Nr. 1.
- Fluoreszenzmikroskop: Für die Abstimmung der Kontrollen mit dem FITC-Konjugat wurde ein Fluoreszenzmikroskop mit folgender Ausstattung verwendet.
- 10X Augenlinse.
- 16X und 40X Objektiv.
- Epi-Beleuchtung mit 50W Halogenlampe.
- FITC-Anregungsfilter KP490.
- Gelbfilter K530.
- Rotunterdrückungsfilter BG38.

Die Fluoreszenz-Markierung besitzt ein Anregungswellenlängenmaximum von 490nm und ein Emissionsmaximum von 520nm. Differenzen in der Endreaktivität und Fluoreszenzintensität können vom Typ und von den Bedingungen der verwendeten Fluoreszenzgeräte im jeweiligen Labor abhängen.

Lagerung und Stabilität

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

Probenentnahme und Lagerung

- Die Serumproben sollten mit aseptischen Labormethoden gewonnen werden. Diese Proben können bei +2 bis +8°C bis zu 1 Woche bzw. für einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.
- Serum- oder Plasmaprobenpaare, mit denen eine Serokonversion oder ein signifikanter Titeranstieg nachgewiesen werden soll, sollten im Abstand von 7-14 Tagen entnommen und bei -20°C gelagert werden. Diese Proben sollten dann parallel getestet werden.

Vorbereitung der Reagenzien und Proben

Vorbereitung der Reagenzien

Waschpuffer: Inhalt eines PBS-Beutels in 1L frisch destilliertes oder deionisiertes Wasser geben. Die rekonstituierte Lösung kann in einem sauberen und verschlossenen Behälter bis zu 4 Wochen bei +2 bis +8°C gelagert werden. Hinweis: Starkes Rühren bei Zugabe der Salze erleichtert deren Lösung.

Alle übrigen Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert.

Vorbereitung der Proben

Qualitativer Test: Proben 1:64 mit Waschpuffer verdünnen. Zur Verdünnung sollte ein Mindestvolumen von 100µl Waschpuffer verwendet werden.

Quantitativer Test: Der "Probentiter" kann durch eine zweifache serielle Verdünnung der Probe in Waschpuffer ermittelt werden, indem man ausgehend von der 1:64-Verdünnung für die weiteren Verdünnungen gleiche Volumina an verdünnter Probe und Waschpuffer verwendet, bis eine "+1" Zuordnung der Fluoreszenz erreicht ist (siehe "Interpretation der Ergebnisse").

Testdurchführung

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

1. **Vorbereitung der Objektträger**

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

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

2. **Inkubation der Proben**

Die Objektträger in einer feuchten Kammer 30 Minuten bei 35-39°C inkubieren.

3. **Waschen der Objektträger**

Die Objektträger vorsichtig mit Waschpuffer vom Rand her mit einer Waschflasche abspülen. Den Pufferstrahl nicht direkt auf die Auftragsstellen richten. Objektträger in einem Waschtrog mit Waschpuffer 10 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) unter leichtem Schütteln

waschen, Puffer nach 5 Minuten wechseln. Objektträger rund um die Auftragsstellen mit dem mitgelieferten Saugpapier trocknen.

4. Inkubation mit dem Konjugat

In jede Auftragsstelle 1 Tropfen (ca. 20µl) des gebrauchsfertigen Konjugats geben. Objektträger in einer feuchten Kammer 30 Minuten bei 35-39°C inkubieren.

5. Waschen der Objektträger

Schritt 3 wiederholen.

6. Auftragen des Einbettungsmediums

In die Mitte jeder Auftragsstelle 1 kleinen Tropfen Einbettungsmedium geben und vorsichtig ein Deckgläschen auflegen.

7. Auswertung der Objektträger

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

8. Bewertung der Farbintensität

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

Interpretation der Ergebnisse

Negative Reaktion

Zeigen die infizierten Zellen keine spezifische Fluoreszenz, enthält die Patientenprobe keine IgG-Antikörper gegen HHV-8.

Positive Reaktion

- Bei lytischen Antigenen fluoresziert die gesamte Zelle, d.h. sowohl das Zytoplasma als auch der Kern.
- Eine Probe gilt als HHV-8 IgG-positiv, wenn die infizierten Zellen bei einer Verdünnung von $\geq 1:64$ eine grüne Fluoreszenz aufweisen und das Farbmuster dem der Positivkontrolle gleicht. Schwach grüne Zellen, die der Positivkontrolle nicht ähneln, werden als negativ eingestuft.

+4 = Kräftig leuchtende, grüne Fluoreszenz, die einen sehr hohen HHV-8 IgG-Antikörpertiter anzeigt.

+3 = Leuchtend grüne Fluoreszenz, die einen hohen HHV-8 IgG-Antikörpertiter anzeigt.

+2 = Grüne Fluoreszenz, die auf einen mäßigen HHV-8 IgG-Antikörpertiter anzeigt.

+1 = Schwache grüne Fluoreszenz, die auf einen schwachen HHV-8 IgG-Antikörper titer hinweist. Sie zeigt die Endpunktverdünnung bzw. den "Titer" der Probe an.

- Die Titration der HHV-8-positiven IgG-Seren liefert quantitative Daten. In einer Titrationsserie wird die höchste Serumverdünnung, die eine "1⁺"-Reaktivität zeigt, als Endpunkt definiert.
- Zur internen Kontrolle enthält jede Auftragsstelle des Objektträgers neben den HHV-8-infizierten Zellen auch nicht-infizierte Zellen; diese Bestückung ist Voraussetzung für eine ordnungsgemäße Auswertung. Die nicht-infizierten Zellen Alpuemeuf werden zur Erzeugung eines kontrastreichen Hintergrunds rot gegengefärbt.

Bewertung

Keine erkennbare Fluoreszenz der infizierten Zellen in der untersuchten Verdünnung.	Probe ist negativ; sie enthält keine IgG-Antikörper gegen HHV-8.
Zufällig verteilte grüne Zellen, die keine erkennbare Fluoreszenz von infizierten Zellen zeigen.	Probe ist negativ; sie enthält keine IgG-Antikörper gegen HHV-8.
Infizierte Zellen, die aber noch nicht einmal die Kriterien der +1-Reaktivität erfüllen.	Probe ist nicht-reaktiv und wird als HHV8 IgG-negativ bewertet.
Spezifische positive Fluoreszenz der infizierten Zellen bei der Ausgangs- oder höherer Verdünnung.	Probe ist positiv; Anwesenheit von IgG-Antikörpern gegen HHV-8 weisen auf eine frühere HHV-8-Infektion hin. Serokonversion oder ein vierfacher bzw. größerer Anstieg im IgG-Antikörpertiter von Serum-Probenpaaren zeigen eine frische Infektion mit HHV-8 an.
Fluoreszenz der infizierten als auch nicht-infizierten Zellen.	Probe zeigt eine unspezifische Reaktion.

Qualitätskontrollkriterien

Bei jedem Test müssen Positivkontrolle, Negativkontrolle und ein so genannter Leerwert, bei dem nur Waschpuffer auf die Auftragsstelle pipettiert wird, mitgeführt werden. Die Ergebnisse eines Tests werden nur dann als gültig betrachtet, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

1. Die in diesem Kit enthaltene HHV-8 IgG-Positivkontrolle zeigt eine Fluoreszenzintensität von $\geq +2$.
2. Die in diesem Kit enthaltene HHV-8 IgG-Negativkontrolle zeigt keine sichtbare Fluoreszenz.
3. Die nur Waschpuffer enthaltende Auftragsstelle zeigt keine sichtbare Fluoreszenz.

Hinweis: Die nur Waschpuffer enthaltende Auftragsstelle dient als Konjugatkontrolle, die sicher stellen soll, dass das Konjugat nicht mit dem Zellsubstrat reagiert.

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

Referenzwerte

Durchseuchungsraten werden normalerweise anhand umfangreicher Untersuchungen von Antikörperspiegeln in einer hinsichtlich Alter, Geschlecht, geographischer Herkunft und sozioökonomischem Status definierten Population bestimmt.

Die Seroprävalenz von HHV-8 unter Blutspendern liegt in den Vereinigten Staaten und Nordeuropa im Bereich von 5-10%⁽⁴⁾, in Italien und den Mittelmeerländern bei 10-35%⁽⁵⁾ und in vielen afrikanischen Populationen bei über 50%⁽⁶⁾.

Limitationen des Tests

- Serologische Tests wie der IFT dienen beim Nachweis von viralen Infektionen als Hilfe, sollten aber nicht als alleiniges Diagnosekriterium eingesetzt werden. Die Testergebnisse sollten immer mit dem klinischen und epidemiologischen Profil sowie anderen klinischen Laborergebnissen der Patienten verglichen werden.
- Ein einzelnes positives Ergebnis auf IgG-Antikörper gegen HHV-8 ist nur insofern signifikant, dass es auf einen früheren Kontakt bzw. eine frühere Infektion mit dem Virus hinweist und dementsprechend von epidemiologischem Interesse ist. Es kann aber nicht zum Nachweis einer akuten oder frischen Infektion herangezogen werden. Zur Bestimmung einer akuten oder frischen Infektion sollten Plasma- oder Serumprobenpaare, die im Abstand von 7-14 Tagen gewonnen wurden, parallel getestet werden. Ein vierfacher oder größerer Titeranstieg zwischen der ersten und der zweiten Probe weisen auf eine akute oder frische Infektion hin.

- In der Biotrin-Studie wurden in Proben von Patienten mit bestimmten Autoimmunerkrankungen, die z.B. Antikörper gegen den Kern und/oder das Zytoplasma der Zellen (antinukleäre Antikörper, ANAs) bilden, unspezifische positive Reaktionen festgestellt. Dabei fluoreszieren sowohl die infizierten als auch die nicht-infizierten Zellen und können so eine positive HHV-8-Reaktion überdecken. Die Beobachtung einer Autoimmunreaktion kann demnach die Möglichkeit einer HHV-8-Infektion nicht ausschließen. In dem vorliegenden Test auf lytische Antikörper besteht die Möglichkeit, dass eine positive Reaktion auf antinukleäre Antikörper (ANAs) als positive Reaktion auf lytische Antikörper gewertet wird. Ein Vergleich mit der Positivkontrolle oder ein spezifischer Test der Probe auf antinukleäre Antikörper kann dazu beitragen, falsch-positive Befunde auszuschließen.

Leistungsdaten des Tests

Sensitivität & Spezifität

Diagnostische Sensitivität

Aus einem Pool nachweislich* HHV-8 IgG-positiver Proben wurden 33 Proben mit dem Biotrin HHV-8 IgG IFT auf HHV-8 IgG-Antikörper getestet. Alle 33 Proben wurden positiv befundet, d.h. die Sensitivität des Biotrin-Tests betrug 100%.

Dass dieser Probenpool HHV-8-positiv war, wurde mit einem anderen kommerziell erhältlichen Test bestätigt.

% Sensitivität= eindeutig positive Proben/ (positive + falsch negative + mehrdeutige) x100

$33/(33+0+0) \times 100 = 100\%$

Sensitivität= 100%

Diagnostische Spezifität

Die Spezifität des Biotrin HHV-8 IgG-IFTs wurde anhand von 122 negativen Proben ermittelt. Diese Proben wurden mit dem HHV-8 IgG-IFT von Biotrin sowie zwei weiteren kommerziell erhältlichen Tests analysiert und nach der "Zwei von drei-Regel" als negativ bestätigt. Von diesen 122 Proben wurden 114 negativ und 8 positiv befundet. Nach folgender Gleichung wurde eine Spezifität von 94% ermittelt:

% Spezifität= eindeutig negative Proben/(negative + falsch positive + mehrdeutige) x100

$114/(114+8+0) = 94\%$

Spezifität = 94%

Kreuzreaktivität

Zur Ermittlung der Spezifität des Biotrin HHV-8 IgG-IFTs wurden 42 Serumproben, die von Patienten mit unterschiedlichen Krankheiten stammten, gescreent. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen:

Tabelle 1

Virus	Biotrin HHV8 IgG-IFT
Lyme	0/3
Humanes T-lymphotropes Virus (HTLV)	0/2
Antinukleäre Antikörper (ANA) ¹	3/3
HHV6 IgG	0/3
HIV-1	0/9
Hep C	0/2
Hep B	0/2
Cytomegalievirus (CMV IgG)	0/4
Epstein-Barr-Virus (EBV)	0/2
Herpes-Simplex-Virus (HSV)	0/3
Varicella-Zoster-Virus (VZV)	0/2

¹ Kreuzreaktivität (siehe unter "Limitationen des Tests")

Interferenzen (Analytische Spezifität)

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

Es wurden einige unspezifische Fluoreszenzen beobachtet, die jedoch eine eindeutig positive Bewertung der Proben anhand der Fluoreszenzintensität nicht beeinträchtigten. Bei allen gefärbten Objektträgern wurde eine ziegelrote Gegenfärbung festgestellt.

Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-Reproduzierbarkeit

Für die Ermittlung der Intra-Assay-Reproduzierbarkeit wurden an einem Tag Kitkontrollen, eine Waschpuffer-Kontrolle (Leerwert) und Proben mit mittlerem und hohem IgG-Titer mit drei voneinander unabhängigen Kit-Produktionschargen in 20 Wiederholungen getestet. Folgende Ergebnisse wurden erzielt.

Tabelle 2

Kontrollen	Charge 1	Charge 2	Charge 3
PK	3+/4+	3+-4+	4+
NK	0	0	0
Waschpuffer	0	0	0
HOCH	Charge 1	Charge 2	Charge 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+
MITTEL	Charge 1	Charge 2	Charge 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-assay-Reproduzierbarkeit

Folgende Ergebnisse wurden beim Screenen von Kit-Kontrollen, einer Waschpuffer-Kontrolle, IgG-Serumproben mit niedrigem, mittlerem und hohem Titer mit zehn verschiedenen Tests und drei Produktionschargen an verschiedenen Tagen ermittelt.

Tabelle 3a

Charge 1

Proben	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Test 7	Test 8	Test 9	Test 10
PK	3+/4+	3+	3+/4+	3+	3+	3+	3+/4+	3+/4+	4+	3+/4+
NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Waschpuffer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hoch	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
Hoch	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+	4+	3+/4+
Mittel	1+/2+	2+	2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	2+	1+	1+/2+	1+
Mittel	1+	1+	1+/2+	1+	1+	1+/2+	2+	1+	2+	1+
PK 1:256*	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
Negativ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3b

Charge 2

Proben	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Test 7	Test 8	Test 9	Test 10
PK	4+	3+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+	3+	3+	3+/4+
NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Waschpuffer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hoch	3+/4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
Hoch	4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+
Mittel	2+	2+	1+/2+	2+	2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	2+
Mittel	1+	1+	1+	1+/2+	1+	1+/2+	1+	1+	1+/2+	1+/2+
PK 1:256*	1+/2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+/2+
Negativ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 3c

Charge 3

Proben	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Test 7	Test 8	Test 9	Test 10
PK	3+	3+	3+/4+	4+	3+/4+	4+	3+/4+	3+/4+	4+	3+
NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Waschpuffer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hoch	3+	3+	3+	4+	2+/3+	3+	2+/3+	3+	3+	2+/3+
Hoch	4+	3+/4+	3+/4+	4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+
Mittel	1+	1+	1+/2+	2+/3+	1+/2+	1+/2+	2+	1+/2+	2+	1+
Mittel	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+/2+	1+	1+
PK 1:256*	2+	1+/2+	1+/2+	2+	2+	1+/2+	1+	2+	2+	1+
Negativ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Ein Titer der 1:256 in Waschpuffer verdünnten Positivkontrolle war enthalten.

Zusammenfassung des HHV-8 IFT

Wichtiger Hinweis:

Bitte vor Beginn des Tests die gesamte Produktbeschreibung einschließlich der Anleitung zur Testdurchführung durchlesen! Diese Zusammenfassung dient ausschließlich dem Überblick.

Qualitative Bestimmung: Patientenprobe 1:64 in Waschpuffer verdünnen

Quantitative Titrierung: Die 1:64 verdünnte Probe seriell 1+1 mit Waschpuffer weiterverdünnen



- ~20µl Positivkontrolle in das Auftragsfeld Nr. 1 des Objektträgers pipettieren
- ~20µl Negativkontrolle in das Auftragsfeld Nr. 2 des Objektträgers pipettieren
- ~20µl Waschpuffer in das Auftragsfeld Nr. 3 des Objektträgers pipettieren
- ~20µl verdünnte Probe in alle übrigen Auftragsfelder pipettieren (eine Probe pro Auftragsfeld)



Objektträger 30 Minuten bei 35-39°C inkubieren



Objektträger mit Waschpuffer waschen



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



Objektträger 30 Minuten bei 35-39°C inkubieren



Objektträger mit Waschpuffer waschen



10µl Einbettungsmedium in jedes Auftragsfeld geben und Deckglas auflegen











Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop auswerten

Literatur

1. Chang Y. *et al* Science 265:1865-1869, 1994.
2. 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.
3. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (Human Herpesvirus 8) : epidemiology and pathogenesis. T. F Schulz. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2000; 45, Topic T3, 15-27.
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. Outcome of kidney transplant recipients with previous human herpesvirus-8 infection. Frances C. *et al.* Transplantation 2000; 69 (9) 1776-1779.
9. Emerging viral infections relevant to transfusion medicine. J. P. Allain. Blood Reviews 2000; 14, 173 - 181.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Kaposi's sarcoma. Karen Antman. Medical Progress 2000; 342; 14 1027-1037.

Erläuterung der Symbole

In-vitro-Diagnostikum	
Charge	
Katalog-Nr.	
Temperaturgrenze	
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.

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



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

www.biotrin.com