

ITALIANO

N. Codice: V18HHV8
Formato kit: 6X10 well slides
HHV-427-03



**Herpesvirus umano tipo-8
Dosaggio in immunofluorescenza delle IgG**

Kit in immunofluorescenza per la determinazione degli anticorpi litici IgG del virus HHV-8



Indice

Uso previsto

Introduzione

Principio del test

Precauzioni

Sicurezza

Procedura

Contenuto del kit

Materiali forniti

Ulteriori materiali richiesti

Conservazione e stabilità

Raccolta e conservazione dei campioni

Preparazione dei reagenti e dei campioni

Procedura del test

Interpretazione dei risultati

Criteri del Controllo Qualità

Valori previsti

Restrizioni nell'uso

Prestazioni del test

Riassunto della procedura del kit IFA IgG HHV-8

Bibliografia

Interpretazione dei simboli

Altri prodotti Biotrin

Uso previsto

Il test in immunofluorescenza indiretta (IFA) per la determinazione degli anticorpi dell'HHV-8 (Herpesvirus umano di tipo 8) è inteso per la determinazione qualitativa e semi-quantitativa degli anticorpi IgG contro gli antigeni litici dell'HHV-8 in siero e plasma umano. La determinazione degli anticorpi IgG anti HHV-8 può essere di aiuto nella diagnosi delle infezioni primarie o nella riattivazione/reinfezione con questo virus.

Introduzione

L' Herpesvirus umano-8 (HHV-8), noto anche come agente eziologico del sarcoma di Kaposi (KSHV), è stato scoperto nel 1994 quando Chang *et al* hanno individuato due frammenti di DNA simile a quello dell'herpesvirus nelle lesioni di un paziente affetto da sarcoma di Kaposi associato ad AIDS⁽¹⁾. Il virus è classificato come un gamma herpesvirus (genere radinovirus) e ricorda il virus di Epstein-Barr (EBV) nel suo tropismo per le cellule B e la capacità di esistere in stato di latenza. Sono ora presenti forti evidenze epidemiologiche sul ruolo causativo dell'HHV-8 nella patogenesi del sarcoma di Kaposi (KS). L'HHV-8 è rintracciabile in tutte le forme della malattia: KS classico (un tumore maligno raro, presente tra gli anziani di sesso maschile dell'area del Mediterraneo) KS africano endemico, KS da trapianto e KS associato all'AIDS.

La trasmissione attraverso contatto sessuale gioca un ruolo importante nella diffusione dell'HHV-8 tra gli omosessuali⁽²⁾. Tuttavia l'HHV-8 può anche essere trasmesso attraverso la saliva e gli organi trapiantati⁽³⁾.

In letteratura è stato riportato che il tasso di sieroprevalenza dell'HHV-8 nella popolazione generale varia in un intervallo del 5-35% a seconda del tipo di dosaggio immunologico impiegato e dell'area geografica presa in esame. In una serie di studi sono stati osservati tassi molto elevati di anticorpi IgG in pazienti affetti da KS ma non nei donatori sani. Il tasso di sieroprevalenza dell'HHV-8, dunque, è diverso da EBV, HHV-6, HHV-7, CMV, o HSV-1, dove oltre l'80% della popolazione risulta positiva alla ricerca degli anticorpi per questi virus.

La sieroprevalenza dell'HHV-8 tra i donatori di sangue è compresa tra il 5 e il 10% negli Stati Uniti e nel Nord Europa⁽⁴⁾, tra il 10 e il 35% in Italia e nei paesi mediterranei⁽⁵⁾, e supera il 50% nella popolazione africana⁽⁶⁾.

La prevalenza di anticorpi dell'HHV-8 nella popolazione generale si pensa sia correlata alla frequenza del sarcoma di Kaposi in seguito a trapianto⁽⁷⁾. E' stata Anche documentata la trasmissione tra donatore d'organo e ricevente. L'associazione dell'HHV-8 nei pazienti che hanno ricevuto trapianto ha portato alla raccomandazione che sui donatori di organi e i destinatari del trapianto venga eseguito uno screening per individuare la presenza di anticorpi dell'HHV-8^(8,9). E' stato dimostrato che nei pazienti sieropositivi, gli anticorpi dell'HHV-8 precedono e preannunciano lo sviluppo del sarcoma di Kaposi⁽¹⁰⁾. Il KS è la neoplasia più comune in questo gruppo di pazienti. L'HHV-8 è stato anche associato ai linfomi delle cavità corporee, la malattia di Castleman multicentrica, il linfoma non-Hodgkin e il mieloma multiplo⁽¹¹⁾.

Attualmente la diagnosi dell'infezione da HHV-8 può essere confermata mediante analisi in PCR e i dosaggi immunologici, ad esempio IFA ed ELISA. Tuttavia, il DNA dell'HHV-8 può essere rilevato nelle cellule del sangue periferico solo nella metà

degli individui infetti utilizzando test in PCR⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Poiché l'analisi in PCR sembra esibire una sensibilità bassa quando viene usato il DNA delle cellule del sangue periferico come stampo, i test sierologici si sono dimostrati molto utili negli studi epidemiologici e nella diagnosi dell'infezione da HHV-8, in particolare nel rilevare una precedente esposizione al virus^(11,12).

Studi sierologici hanno individuato anticorpi specifici per HHV-8 nell' 80-97% dei pazienti sieropositivi affetti da KS, nel 54-100% dei pazienti sieropositivi che hanno sviluppato il KS nei 5 anni intercorsi dal prelievo del campione, e nel 16-56% dei pazienti che non hanno sviluppato il KS⁽¹³⁾. Per contro, la PCR ha individuato l'HHV-8 rispettivamente solo nel 40-50%, 30% e 5-10% dei rispettivi gruppi di pazienti.

Il kit HHV-8 di Biotrin si basa su una linea cellulare che esprime l'antigene litico, consentendo di individuare gli anticorpi diretti contro proteine virali litiche.

Diversi farmaci contro l'herpesvirus, quali il ganciclovir, hanno dimostrato attività contro l'HHV-8 *in vivo*, ma i dati clinici a disposizione sono limitati. È necessario eseguire ulteriori ricerche cliniche su diversi campioni ematici per definire l'aumento e il calo dei livelli di anticorpi dell' HHV-8 al fine di correlare queste informazioni con l'infezione da HHV-8 e gli stati della malattia come il sarcoma di Kaposi.

Principio del test

Il kit in immunofluorescenza indiretta di Biotrin è un sistema rapido e semplice per determinare gli anticorpi degli antigeni litici dell'Herpesvirus umano 8. Il test utilizza il metodo indiretto di colorazione utilizzando anticorpi fluorescenti. La procedura si svolge in due fasi principali di reazione:

Nella prima fase, il siero o plasma umano da testare viene messo in contatto con le cellule infette fissate. L'anticorpo, se presente nel campione da testare, formerà un complesso con l'antigene nel substrato cellulare. Se il campione non contiene l'anticorpo per questo antigene particolare, non si formerà alcun complesso e tutti i componenti del siero saranno eliminati tramite il ciclo di risciacquo.

La seconda fase consiste nell'aggiunta dell'anticorpo anti-umano marcato con fluoresceina. Se l'anticorpo diretto contro HHV-8 è presente (reazione positiva), con il microscopio a fluorescenza è possibile vedere una forte fluorescenza color verde mela.

Precauzioni

Sicurezza

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Questo kit deve essere utilizzato esclusivamente da personale di laboratorio qualificato.
- Il kit contiene materiali di origine umana, considerati MATERIALI POTENZIALMENTE A RISCHIO BIOLOGICO. I controlli sono stati testati e sono risultati negativi all'HBsAg e agli anticorpi dell' HIV 1/2 e HCV. Tuttavia, poiché nessun test può garantire con sicurezza la totale assenza di virus, si consiglia di trattare tutti i controlli come potenzialmente infetti.
- Alcuni reagenti contengono timerosal, che può essere tossico se ingerito.

- Evitare il contatto con Blue Evans in quanto potenziale carcinogeno. In caso di contatto con la cute, sciacquare abbondantemente con acqua.
- Alcuni reagenti contengono sodio azide, che può formare complessi metallo-azide potenzialmente esplosivi a contatto con tubature di piombo e di rame. Per lo smaltimento, i reagenti dovrebbero essere eliminati con abbondanti quantità d'acqua per evitare che l'azide possa accumularsi.
- Eliminare tutti i campioni clinici e i materiali infetti o potenzialmente tali in conformità con la normale prassi di laboratorio. Tutti i suddetti materiali vanno trattati e smaltiti considerandoli potenzialmente infetti.
- I residui di sostanze chimiche, preparati e componenti del kit vengono generalmente considerati rifiuti nocivi. Tali materiali vanno smaltiti in conformità con le procedure di sicurezza previste.
- Indossare indumenti protettivi, guanti in lattice monouso e proteggere gli occhi mentre si maneggiano i campioni e si esegue il test. Lavarsi accuratamente le mani una volta terminato.
- Non pipettare i materiali a bocca, non mangiare né bere sulle superfici di lavoro del laboratorio.

Procedura

- Non utilizzare il kit o i singoli reagenti dopo la data di scadenza.
- Non mescolare o sostituire reagenti provenienti da kit con lotti diversi.
- Non utilizzare campioni o reagenti contaminati.
- Modifiche rispetto al protocollo fornito possono dare luogo a risultati erranei.
- L'esecuzione del test oltre i tempi e le temperature previste può invalidarne i risultati. I test che non rientrano nei tempi prestabiliti e negli intervalli di temperatura previsti devono essere ripetuti.
- È necessaria acqua distillata o deionizzata di alta qualità per il tampone di lavaggio concentrato. L'uso di acqua contaminata o di cattiva qualità può portare alla presenza di un colore di fondo. Assicurarsi che il tampone di lavaggio concentrato sia miscelato accuratamente.
- Lasciare che i reagenti arrivino a temperatura ambiente (20-25°C) e mescolarli bene prima dell'uso.
- Non estrarre i vetrini dal loro involucro protettivo fino a quando non sono pronti all'uso. Lasciare che i vetrini si equilibrino a temperatura ambiente prima di aprire l'involucro protettivo che serve a proteggere il contenuto dalla condensa.
- Evitare di lasciare i reagenti alla luce diretta del sole e/o a temperature superiori a 2-8°C per periodi prolungati.
- Durante la colorazione di più campioni su un vetrino evitare la contaminazione reciproca dei campioni delimitando i pozzetti con una matita a cera.
- L'uso di una quantità eccessiva di liquido di montaggio può produrre una fluorescenza sfuocata.
- Usare sempre prodotti in vetro puliti e preferibilmente monouso per la preparazione di tutti i reagenti.
- Prestare attenzione affinché i componenti del kit non vengano contaminati e usare sempre puntali nuovi per la pipetta ad ogni campione e componente.
- Non graffiare il pozzetto del vetrino con il puntale della pipetta o il contagocce.
- Prima di iniziare il test, stabilire uno schema di identificazione e distribuzione dei campioni.

Contenuto del kit

Materiali forniti

1. Vetrini con antigene per HHV-8:

SLIDE

6 vetrini da 10 pozzetti di linfociti umani che esprimono antigeni litici dell'HHV-8 in ogni pozzetto. I vetrini sono pronti all'uso dopo essere stati tolti dall'involucro protettivo.
2. Controllo positivo IgG dell'HHV-8 *:

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

1 x 500µl Controllo umano positivo all'anticorpo IgG anti HHV-8. Contiene sodio azide. Pronto all'uso.
3. Controllo negativo*:

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

1 x 500µl Controllo umano negativo all'anticorpo IgG anti HHV-8. Contiene sodio azide. Pronto all'uso.
4. IgG anti-umano coniugato con FITC*:

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

1 x 1,8ml anticorpo anti-umano IgG di capra (catena pesante e leggera) coniugato con fluoresceina (inattivato) con controcolorazioni Blue Evans e Rodamina. Contiene sodio azide. Pronto all'uso.
5. Liquido di montaggio:

MM

1 x 2ml tampone Tris glicerolo. Contiene timerosal (0,01%). Pronto all'uso
6. Tampone di lavaggio concentrato (PBS):

BUF	WASH	CONJ
------------	-------------	-------------

3x Sacchetti. Ogni pacchetto sigillato in alluminio contenente tampone in polvere serve per preparare un litro di tampone di lavaggio 1x.
7. Carta assorbente per vetrini:

BLT

La carta assorbente ha dei fori pre-tagliati da utilizzare per asciugare la maschera dei vetrini.

8. Istruzioni per l'uso:



*può essere biologicamente pericoloso

Ulteriori materiali richiesti

- Acqua distillata o deionizzata di alta qualità.
- Pipette di precisione da 20µl, 100µl e 200µl e puntali monouso.
- Materiale per la raccolta del siero.

- Timer.
- Flaconi per il lavaggio e vassoio per il lavaggio.
- Provette, supporti, pipette, piastre e dispositivi di sicurezza per il pipettaggio nella diluizione del campione.
- Incubatore a 37°C.
- Camera umida per l'incubazione dei vetrini.
- Portavetrini e piatto di reazione per lavaggio vetrini.
- Vetrini copri oggetto: 22 x 50mm, N. 1 in vetro spesso.
- Microscopio a fluorescenza: Un microscopio a fluorescenza con le seguenti caratteristiche è stato utilizzato per calibrare i controlli e il coniugato:
 - Oculare, 10x.
 - Obiettivi, 16x e 40x.
 - Epi-illuminatore con lampada alogena da 50W.
 - Filtro per eccitazione FITC KP490.
 - Filtro assorbente giallo K530.
 - Filtro soppressione rosso BG38.

La marcatura della fluoresceina ha un picco di eccitazione a 490nm e un picco di emissione a 520nm. La differenza tra le reattività dell'endpoint e l'intensità della fluorescenza può dipendere dal tipo e dalle condizioni della strumentazione a fluorescenza usata nel vostro laboratorio.

Conservazione e stabilità

- Il kit rimane stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna alla confezione, a condizione che sia mantenuto a una temperatura compresa tra 2-8°C. Nota: la carta assorbente può essere conservata a una temperatura compresa tra 2-25°C.
- Tutti i componenti inutilizzati vanno riportati alla temperatura di conservazione (2-8°C) subito dopo il loro utilizzo.
- Il tampone di lavaggio ricostituito rimane stabile fino a 4 settimane se conservato a 2-8°C.

Raccolta e conservazione dei campioni

- I campioni vanno ottenuti tramite tecniche asettiche di laboratorio. I campioni possono essere conservati fino a 1 settimana a 2-8°C e a 20°C per periodi più lunghi. Evitare cicli ripetuti di congelamenti e scongelamenti.
- Le coppie di campioni di siero o plasma prelevati nell'arco di un periodo di tempo per dimostrare la sierconversione o un aumento significativo del titolo vanno prelevati a distanza di 7-14 giorni e conservati a -20°C. Questi campioni vanno poi testati contemporaneamente.

Preparazione dei campioni e dei reagenti

Preparazione dei reagenti

Tampone di lavaggio: Aggiungere l'intero contenuto della confezione di PBS a 1L di acqua distillata o deionizzata appena preparata. Conservare in un contenitore pulito e chiuso a 2-8°C fino a un massimo di 4 settimane. Nota: L'aggiunta di sali durante

un rapido mescolamento dell'acqua faciliterà la solubilizzazione.

Tutti i rimanenti reagenti vengono forniti pronti all'uso.

Preparazione dei campioni

Test Qualitativo: Diluire il campione 1:64 nel tampone di lavaggio. Preparare tutte le diluizioni in un volume minimo di 100µl di tampone di lavaggio.

Test Quantitativo: Il "titolo" del campione può essere determinato preparando diluizioni seriali del campione con tampone di lavaggio, cominciando dalla diluizione 1:64, e aggiungendo poi uguali volumi di campione diluito e buffer di lavaggio per ogni diluizione successiva, fino a raggiungere un grado di fluorescenza pari a '+1' (si veda il paragrafo 'Interpretazione dei risultati').

Procedura del test

Equilibrare i componenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso.

1. Preparazione del vetrino

Rimuovere il numero desiderato di vetrini dall'involucro protettivo e tracciare un contorno tra i pozzetti con una matita a cera per evitare contaminazione. Versare su ogni pozzetto 1 goccia (circa 20µl) di ogni campione diluito da testare, 1 goccia (circa 20µl) dei Controlli Positivo e Negativo pronti all'uso, e 1 goccia di tampone di lavaggio.

Nota: aggiungere una quantità sufficiente a coprire completamente ogni pozzetto, ma evitare di mescolare il contenuto dei vari pozzetti.

2. Incubazione dei campioni

Incubare i vetrini in una camera umida per 30 minuti a 35-39°C.

3. Lavaggio del vetrino

Risciacquare i vetrini lungo il bordo sotto un flusso leggero di tampone di lavaggio con una bottiglia. Evitare di direzionare il flusso direttamente sui pozzetti. Disporre i vetrini su un vassoio contenente tampone di lavaggio per 10 minuti a temperatura ambiente (20-25°C), cambiando la soluzione del tampone di lavaggio dopo 5 minuti, con una leggera agitazione. Asciugare la maschera di colorazione attorno ai pozzetti del test con la carta assorbente in dotazione.

4. Incubazione con il coniugato

Versare 1 goccia (circa 20µl) del coniugato pronto all'uso in ciascun pozzetto da testare. Incubare i vetrini in una camera umida per 30 minuti a 35-39°C.

5. Lavaggio del vetrino

Ripetere la procedura 3.

6. Applicazione del liquido di montaggio

Versare 1 piccola goccia di liquido di montaggio al centro di ogni pozzetto e appoggiarvi un vetrino copri oggetto.

7. Esame del vetrino

Esaminare con un microscopio a fluorescenza usando un ingrandimento 200x-500x. Per ottenere i risultati migliori, esaminare i vetrini subito dopo aver

completato il test (Per ottenere risultati equivalenti, sigillare i vetrini o mantenerli umidificati per ridurre al minimo la disidratazione liquido di montaggio. Conservare al buio a una temperatura di 2-8°C. Leggere entro 3 giorni.)

8. **Classificazione**

La reattività positiva può variare in termini di intensità di fluorescenza da brillante a debole. Classificare la reazione di fluorescenza secondo la scala d'intensità che segue: +4 (brillante), +3 (intensa), +2 (moderata), +1 (debole).

Interpretazione dei risultati

Reazione negativa

Un campione è considerato negativo per gli anticorpi IgG dell'HHV-8 quando la colorazione fluorescente delle cellule infette è assente.

Reazione positiva

- Per quanto riguarda l'antigene litico, l'intera cellula, sia il citoplasma sia il nucleo, saranno fluorescenti.
- Un campione può essere considerato positivo alle IgG dell'HHV-8 quando la colorazione verde fluorescente delle cellule infette è presente a una diluizione di $\geq 1:64$ e lo schema di colorazione è simile a quello del Controllo Positivo. Le cellule color verde sbiadito che non hanno un aspetto simile al Controllo Positivo vengono classificate come risultati negativi.
+4 = Fluorescenza verde brillante che indica risposta dell'anticorpo IgG di HHV-8 a titolo molto alto.
+3 = Fluorescenza verde intenso che indica risposta dell'anticorpo IgG di HHV-8 a titolo alto.
+2 = Fluorescenza verde che indica risposta dell'anticorpo IgG di HHV-8 a titolo medio.
+1 = Fluorescenza verde sbiadito che indica risposta dell'anticorpo IgG di HHV-8 a titolo basso. Essa indica inoltre la diluizione endpoint o il 'titolo' del campione.
- La titolazione dei campioni positivi alle IgG di HHV-8 fornisce informazioni di tipo quantitativo. In una serie di titolazione, la più alta diluizione di siero che dimostra una reazione '+1' viene interpretata come titolo endpoint.
- Allo scopo di fornire un controllo interno, ogni pozzetto del vetrino del microscopio contiene sia cellule infette da HHV-8 sia cellule non infette. La preparazione del vetrino in questo modo è intenzionale. Le cellule non infette, colorate in rosso dalla controcolorazione, servono da sfondo di contrasto.

Significato dell'interpretazione

Nessuna fluorescenza visibile delle cellule infette riscontrata alla diluizione di screening.	Il campione testato è negativo agli anticorpi IgG dell'HHV-8.
Sporadiche cellule verdi che non esibiscono fluorescenza visibile delle cellule infette.	Il campione testato è negativo agli anticorpi IgG dell'HHV-8.
Cellule infette che non sono classificate ad almeno una reazione 1+.	Il campione testato è non-reattivo e viene considerato negativo agli anticorpi IgG dell'HHV-8.
Fluorescenza positiva specifica delle cellule infette riscontrata alla diluizione di screening o a diluizioni più elevate.	Il campione testato è positivo agli anticorpi IgG dell'HHV-8, indicando una precedente infezione con l'HHV-8. La sierconversione o una titolazione quattro volte più alta o ancora maggiore dell'anticorpo IgG nelle coppie di campioni di siero indica recente infezione con l'HHV-8.
Fluorescenza riscontrata sia nelle cellule infette sia nelle cellule non infette.	Il campione testato presenta una reazione non-specifica.

Criteri del Controllo di Qualità

Ogni test deve includere il Controllo Positivo, il Controllo Negativo, e un pozzetto vuoto contenente solo il tampone di lavaggio. I risultati di un test sono considerati validi se vengono rispettati i criteri che seguono:

1. Il Controllo Positivo delle IgG per HHV-8 fornito con il kit ha un'intensità di fluorescenza pari a $\geq +2$.
2. Il Controllo Negativo delle IgG per HHV-8 fornito con il kit non ha fluorescenza visibile.
3. Il pozzetto contenente solo il tampone di lavaggio non ha fluorescenza visibile.

Nota: il pozzetto contenente solo il tampone di lavaggio agisce come controllo del coniugato per garantire che quest'ultimo non reagisca con il substrato cellulare. Se i criteri di cui sopra non sono rispettati, il test viene invalidato e deve essere ripetuto.

Valori previsti

Sieroprevalenza

La prevalenza della malattia è di norma determinata dopo una serie esaustiva di test sui livelli di anticorpi, in una data popolazione, in relazione all'età, al sesso, all'area geografica di provenienza, e alla condizione socioeconomica.

La sieroprevalenza dell'HHV-8 tra i donatori di sangue è compresa tra 5-10% negli Stati Uniti e nel Nord Europa⁽⁴⁾, tra il 10-35% in Italia e nei paesi del Mediterraneo⁽⁵⁾, supera il 50% nella popolazione africana⁽⁶⁾.

Restrizioni nell'uso

- Un test sierologico quale l'IFA serve come aiuto nel determinare l'infezione virale, ma il suo uso non dovrebbe essere l'unico criterio adottato per la diagnosi. I risultati del test devono essere confrontati con il profilo clinico ed epidemiologico del paziente e con i risultati di altri test clinici di laboratorio.
- Un unico risultato positivo per l'anticorpo IgG dell'HHV-8 è significativo solo in quanto indica un contatto o un'infezione precedente con il virus. Ai fini epidemiologici un unico risultato è utile. Non va utilizzato, tuttavia, per indicare un'infezione recente o in corso con il virus. Per determinare infezioni recenti o ancora in corso, va effettuato un test simultaneo su coppie di campioni di plasma o siero prelevati a distanza di 7-14 giorni. Un aumento di titolazione quattro volte maggiore o addirittura superiore tra il primo e il secondo campione è indicativo di infezione recente o in corso.
- Nello studio Biotrin si sono verificate reazioni positive non-specifiche in campioni prelevati da pazienti affetti da determinate malattie autoimmuni come l'anticorpo anti-nucleo (ANA). Sia le cellule infette sia quelle non infette saranno fluorescenti, oscurando così una reazione positiva all'HHV-8. Perciò la presenza di una reazione autoimmune non può eliminare la possibilità di un'infezione da HHV-8. Nel test per l'anticorpo litico, c'è la possibilità che una reazione ANA positiva venga letta come positiva per l'anticorpo litico. Il confronto delle letture da un campione con ANA e la reazione del particolato del Controllo Positivo potrebbe essere utile a eliminare falsi positivi.

Prestazioni del test

Sensibilità & Specificità

Sensibilità diagnostica

Per la presenza degli anticorpi IgG dell'HHV-8, sono stati prelevati e testati con il kit IFA HHV8 IgG di Biotrin 33 campioni presi da un pool noto di campioni positivi. Tutti i 33 campioni sono risultati positivi indicando una sensibilità del 100%. Il pool di campioni positivi è stato verificato con un altro test presente in commercio.

% di Sensibilità = Veri positivi / (Veri positivi + Falsi negativi + Equivoci) x 100

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

Sensibilità = 100%

Specificità diagnostica

La specificità del kit IFA HHV8 IgG di Biotrin è stata valutata testando 122 campioni negativi. Questi campioni si sono confermati negati col kit IFA HHV-8 IgG di Biotrin e a due altri test presenti in commercio applicando la regola del due su tre. Di questi 122 campioni, 114 erano negativi e 8 erano positivi. Si è ottenuta una specificità del 94% sulla base della seguente equazione:

% di Specificità = Veri negativi / (Falsi positivi + Veri negativi + Equivoci) x 100

$$\therefore 114 / (114 + 8 + 0) \times 100 = 94\%$$

Specificità = 94%

Reattività crociata

Al fine di stabilire la specificità del kit IFA IgG HHV-8 di Biotrin, è stato effettuato uno screening su 42 campioni di siero. La tabella che segue riassume i risultati dei campioni di siero prelevati da pazienti affetti dalle seguenti malattie:

Tabella 1

Virus	IFA IgG HHV8 di Biotrin
Malattia di Lyme	0/3
Virus T-linfotrofico umano (HTLV)	0/2
Anticorpo antinucleare (ANA) ¹	3/3
HHV6 IgG	0/3
HIV-1	0/9
Hep C	0/2
Hep B	0/2
Citomegalovirus (CMV IgG)	0/4
Virus di Epstein-Barr (EBV)	0/2
Virus Herpes Simplex (HSV)	0/3
Virus Varicella-Zoster (VZV)	0/2

¹ ha cross-reazione (si veda il paragrafo Limiti d'Uso).

Interferenze (Specificità analitica)

Gli studi sull'interferenza comprendono test per l'emolisi, la bilirubina e il fattore reumatoide. E' stata riscontrata una fluorescenza non-specifica. Tuttavia, questi risultati non hanno interferito con l'interpretazione dell'intensità della fluorescenza nel determinare un risultato positivo. E' stata riscontrata una controcolorazione rosso mattone su tutti i vetrini colorati.

Riproducibilità**Riproducibilità intra -saggio**

I seguenti risultati sono stati ottenuti quando i controlli del kit, un controllo del Tampone di lavaggio e campioni IgG a titolo medio e alto sono stati testati 20 volte con 3 lotti diversi nella stessa giornata.

Tabella 2

Controlli	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3
CP	3+/4+	3+-4+	4+
CN	0	0	0
Tampone di lavaggio	0	0	0
ALTO	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 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+
MEDIO	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 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+

Riproducibilità inter-saggio

I seguenti risultati sono stati ottenuti quando i controlli del kit, un controllo del tampone di lavaggio e campioni di siero IgG a titolo basso, medio e alto sono stati testati dieci volte con tre lotti diversi eseguiti in giorni diversi.

Tabella 3a

Lotto 1

Campioni	Saggio 1	Saggio 2	Saggio 3	Saggio 4	Saggio 5	Saggio 6	Saggio 7	Saggio 8	Saggio 9	Saggio 10
CP	3+/4+	3+	3+/4+	3+	3+	3+	3+/4+	3+/4+	4+	3+/4+
CN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tampone di lavaggio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alto	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
Alto	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+	4+	3+/4+
Medio	1+/2+	2+	2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	2+	1+	1+/2+	1+
Medio	1+	1+	1+/2+	1+	1+	1+/2+	2+	1+	2+	1+
CP 1:256*	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
Negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 3b

Lotto 2

Campioni	Saggio 1	Saggio 2	Saggio 3	Saggio 4	Saggio 5	Saggio 6	Saggio 7	Saggio 8	Saggio 9	Saggio 10
CP	4+	3+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+	3+	3+	3+/4+
CN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tampone di lavaggio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alto	3+/4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
Alto	4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+
Medio	2+	2+	1+/2+	2+	2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	2+
Medio	1+	1+	1+	1+/2+	1+	1+/2+	1+	1+	1+/2+	1+/2+
CP 1:256*	1+/2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+/2+
Negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 3c

Lotto 3

Campioni	Saggio 1	Saggio 2	Saggio 3	Saggio 4	Saggio 5	Saggio 6	Saggio 7	Saggio 8	Saggio 9	Saggio 10
CP	3+	3+	3+/4+	4+	3+/4+	4+	3+/4+	3+/4+	4+	3+
CN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tampone di lavaggio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alto	3+	3+	3+	4+	2+/3+	3+	2+/3+	3+	3+	2+/3+
Alto	4+	3+/4+	3+/4+	4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+
Medio	1+	1+	1+/2+	2+/3+	1+/2+	1+/2+	2+	1+/2+	2+	1+
Medio	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+/2+	1+	1+
CP 1:256*	2+	1+/2+	1+/2+	2+	2+	1+/2+	1+	2+	2+	1+
Negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* è stato incluso un titolo di Controllo Positivo diluito 1:256 nel tampone di lavaggio

Riassunto della procedura del kit IFA IgG HHV-8

Nota Bene:

Si prega di leggere per intero la scheda tecnica del prodotto prima di iniziare il test. Questo riassunto è da intendersi solo come mezzo di consultazione veloce.

Determinazione qualitativa: Diluire il campione del paziente 1:64 utilizzando il tampone di lavaggio

Titolazione quantitativa: Iniziare con una diluizione 1:64 del campione con il tampone di lavaggio, poi aggiungere volumi uguali di campione diluito e tampone di lavaggio per ogni diluizione successiva.



Aggiungere ~20µl di controllo positivo nel pozzetto #1 del vetrino
Aggiungere ~20µl di controllo negativo nel pozzetto #2 del vetrino
Aggiungere ~20µl di tampone di lavaggio nel pozzetto #3 del vetrino
Aggiungere ~20µl di campione diluito nei restanti pozzetti (un campione per pozzetto)



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



Lavare il vetrino con il tampone di lavaggio



Aggiungere ~20µl (1 goccia) di coniugato a ogni pozzetto



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



Lavare i vetrini con il tampone di lavaggio



Mettere 10µl di liquido di montaggio in ogni pozzetto e aggiungere il vetrino copri oggetto



Esaminare il vetrino al microscopio in fluorescenza

Bibliografia

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.

Interpretazione dei simboli

Dispositivo medico diagnostico *in-vitro*

IVD

Codice del lotto

LOT

Numero di codice

REF

Limite di temperatura



Da usare entro



Produttore



Nocivo se ingerito.
Il contatto con gli acidi libera
gas molto tossici.



Istruzioni per l'uso



Altri prodotti Biotrin

Biotrin International offre una gamma esclusiva di test per l'herpesvirus umano per la diagnosi di routine di laboratorio.

Cat #:	Description	Assay Format
V3HHV6	Human Herpesvirus-6 IgG IFA	4 X 10 wells slides
V17HHV6	Human Herpesvirus-6 IgM IFA	4 X 10 wells slides
V15HHV6	Human Herpesvirus-6 IgG EIA	96 well plate EIA
V18HHV8	Human Herpesvirus-8 IgG IFA	6 X 10 wells 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



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

www.biotrin.com