

PORTUGUÊS

Nº Catálogo: V18HHV8
Formato de Kit: 6x10 well slides
HHV-427-03



Herpesvírus Humano-8 Ensaio de Imunofluorescência IgG

Um ensaio de imunofluorescência para a detecção de anticorpos líticos do Herpesvírus Humano-8 IgG.



Índice

Indicações de utilização

Introdução

Princípio do ensaio

Precauções

Segurança

Procedimentos

Componentes do Kit

Materiais fornecidos

Materiais adicionais necessários

Conservação e estabilidade

Recolha e conservação de amostras

Preparação da amostra e do reagente

Procedimento do ensaio

Interpretação de resultados

Critérios de Controlo de Qualidade

Valores esperados

Limitações de utilização

Características de desempenho

Resumo do procedimento de IFA em IgG de HHV-8

Referências

Interpretação de símbolos

Produtos adicionais Biotrin

Indicações de utilização

O Ensaio de Imunofluorescência Indirecta (IFA) para o anticorpo do Herpesvírus Humano-8 (HHV-8) destina-se à determinação qualitativa e semi-quantitativa do anticorpo IgG para os antígenos líticos HHV-8 no soro ou plasma humano. A detecção do anticorpo de IgG em HHV-8 em seres humanos pode ser usado como uma ajuda no diagnóstico de infecção primária ou reactivação/reinfecção com este vírus.

Introdução

O Herpesvírus Humano-8 (HHV-8), também conhecido como Herpesvírus Associado com o Sarcoma de Kaposi (KSHV), foi descoberto em 1994 quando Chang *et al* identificaram dois fragmentos parecidos com o DNA do herpesvírus nas lesões de um doente com SIDA associada com Sarcoma de Kaposi⁽¹⁾. O vírus é classificado como um herpesvírus gama (gênero radinovirus) e parece-se com o EBV no seu tropismo para células B e a sua capacidade para existir em estado latente. Existe agora uma evidência epidemiológica muito forte do papel etiológico do HHV-8 na patogénese do Sarcoma de Kaposi (KS). HHV-8 é detectável em todas as formas da doença: KS clássico (uma forma maligna rara que ocorre em homens mediterrânicos), KS africano e endémico, KS associado a transplante e KS associado a SIDA.

A transmissão através do contacto sexual desempenha um papel importante na disseminação de HHV-8 entre homens homossexuais⁽²⁾. No entanto, HHV-8 pode também ser transmitido pela saliva e órgãos transplantados⁽³⁾.

A frequência de seroprevalência de HHV-8 na população geral foi relatada na literatura científica como variando entre 5-35% dependendo do tipo de ensaio imunológico usado e da área geográfica estudada. Em vários estudos relatados, títulos elevados de anticorpos IgG foram observados em doentes com KS, mas não em dadores normais. Assim, a frequência de seroprevalência de HHV-8 é diferente de EBV, HHV-6, HHV-7, CMV, ou HSV-1, onde >80% da população é positiva para anticorpos para estes vírus.

A seroprevalência de HHV-8 entre dadores de sangue, varia entre 5-10% nos Estados Unidos e Europa do Norte⁽⁴⁾, 10-35% na Itália e países mediterrânicos⁽⁵⁾, e mais de 50% em populações africanas⁽⁶⁾.

Pensa-se que a prevalência de anticorpos HHV-8 na população geral esteja relacionada com a frequência de KS após transplante⁽⁷⁾. A transmissão do enxerto do dador para o receptor também foi documentada. A associação de HHV-8 em receptores de transplante levou à recomendação que os dadores e receptores de órgãos devem ser examinados para anticorpos de HHV-8^(8,9). Em doentes positivos para HIV, demonstrou-se que os anticorpos de HHV-8 precedem e predizem o desenvolvimento de KS⁽¹⁰⁾. KS é a neoplasia mais comum neste grupo de doentes. HHV-8 também tem sido associado com linfomas de cavidades orgânicas, doença de Castleman multicêntrica, linfomas não-Hodgkin e mieloma múltiplo⁽¹¹⁾.

No momento, o diagnóstico para a infecção de HHV-8 pode ser confirmado pela análise de PCR e por ensaios imunológicos, por exemplo, IFA e ELISA. No entanto, o DNA de HHV-8 pode ser detectado nas células do sangue periférico de cerca de metade das pessoas infectadas com a utilização de ensaios padrão de PCR⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Como os sistemas de detecção de PCR parecem mostrar baixa sensibilidade quando o DNA de células de sangue periférico é usado como matriz, os ensaios sorológicos provaram serem mais úteis para estudos epidemiológicos e diagnóstico de infecção de HHV-8, particularmente por detectarem uma exposição anterior ao vírus^(11,12). Os estudos sorológicos detectaram anticorpos específicos a HHV-8 em 80-97% de doentes positivos a HIV com KS, 54-100% de doentes positivos para HIV que desenvolveram KS dentro de 5 anos da recolha de amostras e 16-56% de doentes que não desenvolveram KS⁽¹³⁾. Em contraste, o PCR detectou HHV-8 em apenas 40-50%, 30% e 5-10% dos mesmos grupos de doentes, respectivamente.

O kit de Biotrin de HHV-8 baseia-se numa linha celular que expressa o antígeno lítico, permitindo a detecção de anticorpos a proteínas virais líticas.

Vários fármacos anti-herpesvírus, tais como ganciclovir, mostraram alguma actividade contra HHV-8 *in vivo*, mas os dados clínicos disponíveis são limitados. É necessária maior pesquisa clínica em várias recolhas de sangue para definir a elevação e queda dos níveis de anticorpos para HHV-8 para correlacionar a informação com a infecção de HHV-8 e doenças como KS.

Princípio do ensaio

O sistema de ensaio de imunofluorescência indirecta de Biotrin é um método rápido e simples para a determinação de anticorpos para os antígenos líticos do Herpesvírus Humano tipo-8. O ensaio de fluorescência de anticorpos utiliza o método indirecto de marcação de anticorpos por fluorescência. O procedimento é efectuado em duas fases básicas de reacção:

Na primeira fase, o soro e plasma humanos a serem testados, são trazidos em contacto com células fixas, infectadas. O anticorpo, se estiver presente na amostra do teste, irá formar um complexo com o antígeno no substrato celular. Se a amostra a ser examinada não contiver anticorpo para este antígeno particular, nenhum complexo é formado e todos os componentes do soro são lavados no ciclo de passagem por água.

A segunda fase envolve adicionar anticorpo anti-humano marcado com fluoresceína. Se o anticorpo contra HHV-8 estiver presente (uma reacção positiva), pode ver-se uma fluorescência luminosa verde-maçã com a ajuda de um microscópio fluorescente.

Precauções

Segurança

- Apenas para utilização de diagnósticos *in vitro*.
- Este kit destina-se a ser utilizado exclusivamente por pessoal de laboratório qualificado.
- Este kit contém materiais de origem humana, que são considerados com RISCO BIOLÓGICO POTENCIAL. Os controlos foram testados e são negativos para Ag de HBs e anticorpos de HIV 1/2 e HCV. No entanto, como nenhum método de teste pode oferecer garantia completa da ausência de vírus, trate todos os Controlos como potencialmente infecciosos.
- Alguns reagentes contêm Tiomersal, que pode ser tóxico se for ingerido.
- Evite contacto com Azul Evans pois é um carcinogénico potencial. Se ocorrer

contacto com a pele, passe sob grandes quantidades de água.

- Alguns reagentes contém azida de sódio, que podem formar azidas de metal com potencial de explosão, com a canalização de chumbo e cobre. Ao eliminar, os reagentes devem ser despejados com grandes volumes de água para evitar a formação de azida.
- Elimine todas as amostras clínicas, e os materiais infectados ou potencialmente infectados de acordo com a boa prática de laboratório. Tais materiais devem ser manuseados e eliminados como se fossem potencialmente infecciosos.
- Os resíduos de químicos, preparações e componentes de kits são geralmente considerados como resíduos perigosos. Todos estes materiais devem ser eliminados de acordo com as normas de segurança estipuladas.
- Use roupas de protecção, luvas descartáveis de látex e protecção de olhos ao manusear amostras e ao fazer o ensaio. Lave muito bem as mãos quando tiver acabado.
- Não pipete materiais pela boca e nunca coma ou beba na bancada do laboratório.

Procedimentos

- Não use o kit, nem cada um dos reagentes após o prazo de validade.
- Não misture, nem substitua reagentes de kits com números de lote diferentes.
- Não utilize amostras ou reagentes contaminados.
- O desvio do protocolo dado pode causar resultados erróneos.
- Ao fazer o ensaio fora dos intervalos de tempo e temperatura dados, pode produzir resultados inválidos. Os ensaios que não se enquadrarem nos intervalos de tempo e temperatura estipulados, têm que ser repetidos.
- Água destilada ou deionizada, de alta qualidade, são necessárias para o Concentrado Tampão de Lavagem. A utilização água de baixa qualidade ou contaminada pode levar a alteração do meio. Certifique-se que o Concentrado do Tampão de Lavagem é muito bem misturado.
- Permita que todos os reagentes atinjam temperatura ambiente (20-25°C) e misture bem antes de utilizar.
- Não remova as lâminas da bolsa protectora até estar tudo pronto para utilização. Deixe que as lâminas atinjam temperatura ambiente antes de abrir a bolsa protectora, assim irá proteger o conteúdo de condensação.
- Evite deixar reagentes expostos a luz solar directa e/ou acima de 2-8°C por períodos prolongados.
- Ao marcar amostras múltiplas, numa lâmina evite contaminação cruzada entre as amostras ao marcá-las entre poços com lápis de cera.
- A aplicação de Meio de Montagem em excesso pode levar a turvamento de fluorescência.
- Use sempre utensílios de vidro, limpos, preferivelmente descartáveis, para todas as preparações de reagentes.
- Deve tomar-se cuidado para não contaminar os componentes e use sempre pontas de pipeta frescas, para cada amostra e componente.
- Não arranhe o poço com a ponta da pipeta ou o conta-gotas.
- Antes de iniciar o ensaio, deve estipular um plano de identificação e distribuição.

Componentes do Kit

Materiais fornecidos

1. Lâminas do antígeno HHV-8:

SLIDE

6 x 10 lâminas de poços de linfócitos humanos expressando antígenos líticos de HHV-8 em cada poço de vidro. As lâminas estão prontas para serem usadas após remoção da bolsa protectora.

2. Controlo positivo de IgG HHV-8*:

CONTROL + IgG

1 x 500µl controlo humano positivo para anticorpos de IgG de HHV-8. Contém azida de sódio. Pronto a usar.

3. Controlo negativo*:

CONTROL - IgG

1 x 500µl controlo humano negativo para anticorpos de IgG de HHV-8. Contém azida de sódio. Pronto a usar.

4. Conjugado FITC anti-Humano IgG*:

CONJ IgG

1 x 1,8ml fluoresceína de conjugado de cabra (inactivado) de IgG anti-humana (cadeia pesada e leve) com contra-marcações de Azul Evans e Rodamine. Contém azida de sódio. Pronto a usar.

5. Meios de montagem:

MM

1 x 2ml Tris glicerol tamponado. Contém Tiomersal (0,01%). Pronto a usar.

6. Concentrado de tampão de lavagem (PBS):

BUF WASH CONC

3x Saquetas. Cada pacote selado de alumínio, com tampão em pó, faz um litro de 1x de tampão de lavagem.

7. Absorventes de marcadores de lâmina:

BLT

Absorventes de marcadores têm já orifícios feitos para utilização na secagem da máscara da lâmina.

8. Instruções de utilização:



*Risco biológico potencial

Materiais adicionais necessários

- Água destilada ou desionizada de alta qualidade.
- Pipetas precisas de 20µl, 100µl e 200µl e pontas descartáveis.
- Equipamento de recolha de soro.
- Cronómetro.
- Garrafas e tabuleiros de lavagem.
- Tubos de ensaio, grelhas, pipetas, placas de microtitulação e dispositivos de segurança de pipetagem para fazer diluições de amostra.
- Incubador a 37°C.
- Câmara húmida para lâminas de incubação.
- Grelha de suporte de lâminas e prato de marcação para lâminas em lavagem.
- Coberturas: 22 x 50mm - espessura de vidro nº 1.
- Microscópio de fluorescência: um microscópio de fluorescência equipado com o seguinte, foi usado para calibrar os Controlos e Conjugados:
 - 10x ocular.
 - 16x ou 40x objectivas.
 - Epi-iluminador com lâmpada de halogénio de 50W.
 - FITC-filtro de excitação KP490.
 - Filtro de absorção amarelo K530.
 - Filtro de supressão vermelho BG38.

O rótulo de fluoresceína tem um pico de excitação de 490nm e um pico de emissão de 520nm. A diferença nos parâmetros de reactividade e intensidades de fluorescência pode ser devida ao tipo e condição do equipamento de fluorescência usado no seu laboratório.

Conservação e estabilidade

- O kit é estável até ao prazo de validade indicado no rótulo da embalagem externa, desde que seja conservado entre 2-8°C. Nota: os absorventes de marcadores podem ser guardados entre 2-25°C.
- Todos os componentes não usados devem ser devolvidos para conservação entre 2-8°C, imediatamente após utilização.
- O tampão de lavagem reconstituído é estável até 4 semanas quando conservado entre 2-8°C.

Recolha e conservação de amostras

- As amostras devem ser obtidas usando técnicas assépticas de laboratório. As amostras podem ser conservadas até 1 semana entre 2-8°C e a -20°C por períodos mais longos. Deve evitar-se congelamento e descongelamento repetidos.
- As amostras pareadas de soro ou plasma, recolhidas durante um período de tempo para demonstrarem seroconversão ou aumento significativo do título, devem ser recolhidas com intervalos de 7 – 14 dias, e guardadas a -20°C. Estas amostras devem ser testadas simultaneamente.

Preparação da amostra e do reagente

Preparação do reagente

Tampão de lavagem: adicione todo o conteúdo de uma embalagem de PBS de 1 litro de água destilada acabada de preparar ou deionizada. Guarde num recipiente limpo e fechado a 2-8°C até 4 semanas. Nota: adicione sais enquanto mexendo rapidamente a água para facilitar a solubilização.

Todos os reagentes restantes são fornecidos prontos para utilizar e com diluição de trabalho.

Preparação de amostra

Teste Qualitativo: dilua a amostra de 1:64 tampão de lavagem. Prepare todas as diluições em volume mínimo de 100µl de tampão de lavagem.

Teste Quantitativo: a titulação de amostra pode ser determinada ao preparar diluições séricas, de duas vezes a amostra em Tampão de Lavagem, iniciando a uma diluição de 1:64, e adicionando volumes iguais de amostra diluída e tampão de lavagem por cada diluição consecutiva, até se conseguir fluorescência de grau '+1' (ver 'Interpretação de Resultados').

Procedimento do ensaio

Permita que todos os componentes atinjam a temperatura ambiente (20-25°C) antes de serem utilizados.

1. Preparação da lâmina

Retire o número desejado de lâminas da bolsa protectora e marque entre os poços com um lápis de cera para evitar contaminação. Dispense 1 gota (aproximadamente 20µl) de cada amostra de teste diluída e 1 gota (aproximadamente 20µl) dos controlos positivos e negativos prontos a usar, de Tampão de Lavagem em poços numerados. Nota: adicione volume suficiente para cobrir totalmente cada poço, para evitar misturar o conteúdo entre os poços.

2. Incubar as amostras

Incubar as lâminas em câmara húmida durante 30 minutos a 35-39°C.

3. Lavagem da lâmina

Lave as lâminas ao longo da borda numa corrente ligeira de Tampão de Lavagem usando uma garrafa de lavagem. Evite dirigir a corrente para os poços. Coloque os poços num tabuleiro de lavagem contendo Tampão de Lavagem durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) com uma alteração da solução do tampão de lavagem, após 5 minutos com uma agitação suave. Seque a máscara de tinta à volta dos poços com os absorventes de marcadores dados.

4. Incube com Conjugado

Aplique 1 gota (aproximadamente 20µl) do Conjugado, pronto para usar em cada poço de teste. Incube as lâminas em câmara húmida durante 30 minutos a 35-39°C.

5. Lavagem da lâmina

Repita Fase 3.

6. Aplique o Meio de Montagem

Aplique 1 pequena gota do Meio de Montagem no centro de cada poço e aplique uma cobertura.

7. Examine a lâmina

Examine sob um microscópio fluorescente usando uma magnificação de 200-500x. Para melhores resultados, examine as lâminas imediatamente após acabar o teste (para obter resultados equivalentes, sele as lâminas ou mantenha-as humidificadas para minimizar a desidratação do Meio de Montagem. Guarde em local escuro a 2-8°C. Leia dentro de 3 dias.)

8. Graduação

A reactividade positiva pode variar em intensidade de fluorescência de brilhante a fraco. Classifique a reacção de fluorescência de acordo com a seguinte escala de intensidade: +4 (brilhante), +3 (claro), +2 (moderado), +1 (fraco).

Interpretação de resultados

Reacção negativa

Considera-se que uma amostra é negativa para anticorpos IgG de HHV-8, se não houver marcação fluorescente de células infectadas.

Reacção positiva

- Para o antígeno lítico, toda a célula, tanto o citoplasma como o núcleo vão fluorescer.
- Uma amostra pode considerar-se positiva para IgG de HHV-8 se a marcação fluorescente verde de células infectadas estiver presente, numa diluição $\geq 1:64$ e o padrão de marcação for semelhante ao Controlo Positivo. Células verde escuras que não têm um aspecto semelhante ao do Controlo Positivo são classificadas como negativas.
 - +4 = Fluorescência verde brilhante indicando titulação muito elevada de resposta de anticorpos IgG de HHV-8.
 - +3 = Fluorescência verde brilhante indicando titulação muito elevada de resposta de anticorpos de IgG de HHV-8.
 - +2 = Fluorescência verde indicando titulação média de resposta de anticorpos de IgG a HHV-8.
 - +1 = Fluorescência verde escura indicando uma titulação fraca de resposta de anticorpos de IgG a HHV-8. Isto também o parâmetro de diluição ou "titulação" da amostra.
- A titulação de amostras positivas de IgG de HHV-8 fornece informação quantitativa. Numa titulação sérica, a maior diluição do soro, a demonstrar reacção '+1' é interpretada como parâmetro de titulação.
- Para conseguir um controlo interno, cada poço na lâmina de microscópio contém células de HHV-8, infectadas e não infectadas. A preparação da lâmina, desta forma é intencional. As células não infectadas, marcadas a vermelho pelo contra-marcador, oferecem um fundo de contraste.

Significado de interpretação

Não se encontrou fluorescência discernível na diluição de selecção.	Amostra de teste é anticorpo negativo de IgG de HHV-8.
Células verdes, aleatórias, não mostram fluorescência discernível de células infectadas.	Amostra de teste é anticorpo negativo de IgG de HHV-8
Como células infectadas que não são classificadas, pelo menos reacção 1+.	Amostra de teste é não-reactiva e é considerada anticorpo negativo de IgG de HHV-8
Achou-se que a fluorescência positiva específica de células infectadas na diluição de selecção ou em diluições mais elevadas.	A amostra de teste é anticorpo positivo de IgG de HHV-8, indicando infecção anterior com HHV-8. Seroconversão ou um aumento igual ou superior a quatro vezes um título de anticorpo de IgG em amostras de soro pareadas indica infecção recente com HHV-8.
Encontrou-se fluorescência tanto em células infectadas como não infectadas	A amostra de teste demonstra uma reacção não-específica.

Crítérios de Controlo de Qualidade

Cada ensaio deve incluir um Controlo Positivo, um Controlo Negativo e um poço neutro contendo apenas tampão de lavagem. Os resultados de um ensaio são considerados válidos se forem respondidos os seguintes critérios:

1. O controlo positivo de IgG de HHV-8, fornecido com este kit tem uma intensidade fluorescência $\geq +2$.
2. O controlo negativo de IgG de HHV-8, fornecido com este kit não tem fluorescência visível.
3. O poço contendo apenas Tampão de Lavagem não contém fluorescência visível.

Nota: o poço contendo apenas tampão de lavagem age como um controlo de conjugado para garantir que o conjugado não está a reagir com o substrato da célula.

Se o critério acima não for respondido, o ensaio é considerado inválido e tem que ser repetido.

Valores esperados

Seroprevalência

A prevalência de doenças é geralmente determinada após testes extensos para níveis de anticorpos, numa população dada, de acordo com idade, sexo, localização geográfica, e situação sócio-económica.

A seroprevalência de HHV-8 entre os dadores de sangue varia de 5-10% nos Estados Unidos e Europa do Norte⁽⁴⁾, 10-35% na Itália e países mediterrânicos⁽⁵⁾, a mais de 50% em muitas populações africanas⁽⁶⁾.

Limitações de utilização

- Um teste serológico tal como IFA serve como ajuda para detectar infecção viral, mas a sua utilização não deve ser o único critério. Os resultados de teste devem ser comparados com o perfil clínico e epidemiológico do doente e outros resultados clínicos e laboratoriais.
- Um resultado positivo único para o anticorpo IgG de HHV-8 é significativo apenas no que indica contacto anterior ou infecção com o vírus. Para fins epidemiológicos, um único resultado é útil. No entanto não deve ser usado como uma indicação de infecção actual ou recente com o vírus. Para determinar infecções actuais ou recentes, deve fazer-se o teste simultâneo de amostras pareadas de plasma ou soro tomadas com 7-14 dias de intervalo. Um aumento igual ou superior em titulação entre a primeira e segunda amostra é indicativo de uma infecção actual ou recente.
- No estudo de Biotrin, acharam-se reacções positivas não específicas a ocorrerem em amostras de pacientes com certas doenças auto-imunes tais como anticorpo-antinuclear (ANA). Tanto células infectadas como não infectadas vão fluorescer, obscurecendo, portanto, uma reacção positiva de HHV-8. Portanto, a observação de uma reacção auto-imune não pode eliminar a possibilidade de uma infecção de
- HHV-8. No teste do anticorpo lítico, existe a possibilidade de uma reacção ANA a ser lida como positiva para o anticorpo lítico. A comparação das leituras de uma amostra com ANA, com a reacção particulada de Controlo positivo pode ser útil para eliminar falsos positivos.

Características de desempenho

Sensibilidade & Especificidade

Sensibilidade de diagnóstico

Para anticorpos de IgG de HHV-8, tomaram-se 33 amostras de um conjunto conhecido de amostras positivas e testaram-se com IFA de IgG de HHV-8 Biotrin. As 33 amostras testadas indicaram uma sensibilidade de 100%. O conjunto de amostras positivas foi verificado com outro ensaio comercialmente disponível.

% Sensibilidade = Verdadeiros Positivos/(Positivos Verdadeiros + Negativos Falsos + Equívocos) x 100

∴ 33 / (33 + 0 + 0) x 100 = 100%

Sensibilidade = 100%

Especificidade de diagnóstico

A especificidade de IFA de IgG de HHV-8 de Biotrin foi avaliada ao testar 122 amostras negativas verdadeiras. Estas amostras foram confirmadas como negativas em IFA, de IgG de HHV-8 de Biotrin e dois outros ensaios disponíveis comercialmente, usando a regra de dois em cada três. Destas 122 amostras, 114 foram negativas e 8 foram positivas. 94% especificidade foi obtida baseada na seguinte equação:

% Especificidade = Negativos verdadeiros/(Negativos verdadeiros + Positivos falsos + Equívocos) x 100

∴ 114 / (114 + 8 + 0) x 100 = 94%

Especificidade = 94%

Reactividade cruzada

42 amostras foram testadas de modo a estabelecer qual a especificidade do HHV-8 IgG IFA, da marca Biotrin. A tabela seguinte mostra os resultados das referidas amostras, as quais são de doentes com as seguintes patologias:

Quadro 1

Vírus	IFA de IgG de HHV- 8 de Biotrin
Lyme	0/3
Vírus linfotrófico da Célula-T Humana (HTLV)	0/2
Anticorpo Antinuclear (ANA) ¹	3/3
IgG de HHV6	0/3
HIV-1	0/9
Hep C	0/2
Hep B	0/2
Citomegalovirus (CMV IgG)	0/4
Vírus Epstein Barr (EBV)	0/2
Herpesvírus Simplex (HSV)	0/3
Vírus da Varicella Zoster (VZV)	0/2

¹ Reacção Cruzada (ver Limitações de Utilização).

Interferências (Especificidade Analítica)

Estudos de interferência incluem testes para hemólise, billirubina e factor reumatóide.

Notou-se alguma fluorescência não específica. No entanto, estes não interferem com a interpretação da intensidade de fluorescência para um resultado positivo. Um contra marcador vermelho tijolo foi notado em todas as lâminas marcadas.

Reprodutibilidade

Reprodutibilidade Intra – Ensaio

Os seguintes resultados foram obtidos quando se seleccionaram controlos de kit, um controlo de tampão de lavagem, amostras de titulação média e elevada de IgG, 20 vezes em 3 lotes separados de produção no mesmo dia.

Quadro 2

Controlos	Lote 1	Lote 2	Lote 3
PC	3+/4+	3+-4+	4+
NC	0	0	0
Tampão Lavagem	0	0	0
ELEVADO	Lote 1	Lote 2	Lote 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+
MEIO	Lote 1	Lote 2	Lote 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+

Reprodutibilidade Inter-Ensaio

Obtiveram-se os seguintes resultados quando se seleccionaram controlos de kit, um controlo de tampão de lavagem, amostras de soro de titulação baixa, média e elevada de IgG, em dez ensaios diferentes, em três lotes de produção, em dias diferentes.

Quadro 3a

Lote 1

Amostras	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10
PC	3+/4+	3+	3+/4+	3+	3+	3+	3+/4+	3+/4+	4+	3+/4+
NC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tampão lavagem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Elevado	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
Elevado	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+	4+	3+/4+
Meio	1+/2+	2+	2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	2+	1+	1+/2+	1+
Meio	1+	1+	1+/2+	1+	1+	1+/2+	2+	1+	2+	1+
PC 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

Quadro 3b

Lote 2

Amostras	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10
PC	4+	3+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+	3+	3+	3+/4+
NC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tampão lavagem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Elevado	3+/4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
Elevado	4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+
Meio	2+	2+	1+/2+	2+	2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	2+
Meio	1+	1+	1+	1+/2+	1+	1+/2+	1+	1+	1+/2+	1+/2+
PC 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

Quadro 3c

Lote 3

Amostras	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10
PC	3+	3+	3+/4+	4+	3+/4+	4+	3+/4+	3+/4+	4+	3+
NC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tampão lavagem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Elevado	3+	3+	3+	4+	2+/3+	3+	2+/3+	3+	3+	2+/3+
Elevado	4+	3+/4+	3+/4+	4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+
Meio	1+	1+	1+/2+	2+/3+	1+/2+	1+/2+	2+	1+/2+	2+	1+
Meio	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+/2+	1+	1+
PC 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

* Incluiu-se um título do controlo positivo a uma diluição de 1:256 em tampão de lavagem

Resumo do Procedimento de IFA HHV-8 IgG

Nota importante:

Por favor leia o folheto de instrução do produto, completamente, antes de iniciar este ensaio. Este resumo é apenas para referência rápida.

Determinação qualitativa: dilua a amostra do doente para 1:64 em Tampão de Lavagem

Titulação quantitativa: comece com uma diluição de amostra 1:64 de Tampão de Lavagem, depois adicione volumes iguais de amostras diluídas e Tampão de Lavagem para cada diluição consecutiva,



Adicione ~20µl Controlo Positivo para o poço #1 da lâmina
Adicione ~20µl Controlo Negativo para o poço #2 da lâmina
Adicione ~20µl de tampão de lavagem para o poço #3 da lâmina
Adicione ~20µl amostra diluída dos poços restantes (uma amostra por poço)



Incube a lâmina @ 35-39°C durante 30 minutos



Lâmina de lavagem com tampão de lavagem



Adicione ~20µl (1 gota) Conjugado para cada poço



Incube a lâmina @ 35-39°C durante 30 minutos



Lave as lâminas com Tampão de Lavagem



Coloque 10µl de Meio de Montagem em cada poço e adicione a cobertura



Examine a lâmina sob microscópio de fluorescência

Referências

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.

Interpretação de símbolos

Dispositivo médico de diagnóstico *In-vitro*

IVD

Código do Lote

LOT

Nº de Catálogo

REF

Limitação de Temperatura



Utilize até ao fim de



Fabricante



Perigoso se engolido.
O contacto com ácidos
liberta gases muito
tóxicos.



Instruções de utilização



Produtos adicionais Biotrin

Biotrin International oferece uma carteira única de ensaios de Herpesvírus Humanos, adequado para diagnóstico de rotina de laboratório.

Cat #:	Description	No 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



Para mais informações sobre este produto ou quaisquer outros Produtos Biotrin queira visitar o nosso website

www.biotrin.com