


HHV-8 IgG IFA, Ref: V18HHV8, HHV-427-03 07/09, ES 

ESPAÑOL

Referencia: V18HHV8
Formato del kit: 6x10 well slides
HHV-427-03



**Virus del Herpes-8 Humano
Ensayo de inmunofluorescencia IgG**

Ensayo de inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos IgG líticos frente al virus del Herpes-8 Humano.



Índice

Uso al que se destina

Introducción

Principio del ensayo

Precauciones

Seguridad

Procedimiento

Componentes del kit:

Materiales suministrados

Otros materiales requeridos no suministrados

Conservación y estabilidad

Recogida y conservación de muestras

Preparación de muestras y reactivos

Procedimiento del ensayo

Interpretación de los resultados

Criterios de control de calidad

Valores esperados

Limitaciones de uso

Características de rendimiento

Resumen del procedimiento IFA para IgG del HHV-8

Bibliografía

Interpretación de los símbolos

Otros productos Biotrin

Uso al que se destina

El ensayo por inmunofluorescencia indirecta (IFI o IFA) de los anticuerpos frente al herpesvirus humano-8 (HHV-8) está diseñado para la determinación cualitativa y semicuantitativa de la presencia de anticuerpos IgG frente a antígenos líticos del HHV-8 en suero o plasma humano. La detección de IgG frente a HHV-8 en el ser humano puede usarse como ayuda para el diagnóstico de infección primaria o reactivación o reinfección por este virus.

Introducción

El virus del herpes humano tipo-8 (HHV-8), conocido también como herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) se descubrió en 1994 cuando Chang *et al* identificaron dos fragmentos de ADN semejante al virus del herpes en las lesiones de un paciente con Sarcoma de Kaposi asociado con SIDA⁽¹⁾. El virus se clasifica entre los herpesvirus gamma (género rhadinovirus) y se asemeja a EBV en su tropismo por células B y en su capacidad para persistir en estado latente. Existen en la actualidad fuertes indicios epidemiológicos de la asociación causal del HHV-8 con la patogénesis del sarcoma de Kaposi (KS). El HHV-8 se detecta en todas las formas de la enfermedad: KS clásico (una enfermedad rara que se da en pacientes mediterráneos ancianos), KS africano endémico, KS asociado con trasplantes y KS asociado con SIDA.

La transmisión por contacto sexual desempeña una función importante en la distribución del HHV-8 entre varones homosexuales⁽²⁾. Sin embargo, la transmisión del HHV-8 se realiza también a través de la saliva y el trasplante de órganos⁽³⁾.

En la bibliografía existente se observa que la seroprevalencia del HHV-8 en la población general es del 5 al 35%, dependiendo del tipo de inmunoensayo empleado y la región geográfica estudiada. En varios estudios se observaron niveles de anticuerpo IgG muy elevados en pacientes con SK pero no en donantes normales. Por lo tanto, la tasa de seroprevalencia del HHV-8 difiere de la de EBV, HHV-6, HHV-7, CMV, o HSV-1, ya que más del 80% de la población es positiva a la presencia de anticuerpos de estos virus.

La seroprevalencia del HHV-8 entre donantes de sangre varía entre el 5 y el 10% en los EE.UU. y el norte de Europa⁽⁴⁾, entre el 10 y el 35% en Italia y los países mediterráneos⁽⁵⁾, y sobrepasa el 50% en muchas poblaciones africanas⁽⁶⁾.

La prevalencia de los anticuerpos del HHV-8 en la población general se considera relacionada con la frecuencia de KS tras la realización de trasplantes⁽⁷⁾. También se ha registrado la transmisión del donante alogénico al receptor. La asociación del HHV-8 con receptores de trasplante ha conducido a recomendar que se someta a pruebas de detección de anticuerpos anti-HHV-8 a los donantes y receptores de órganos^(8, 9). En pacientes VIH positivos, se ha demostrado que los anticuerpos del HHV-8 preceden y predicen el desarrollo del KS⁽¹⁰⁾. El KS es la neoplasia más común en este grupo de pacientes. El HHV-8 se ha asociado también con linfomas de cavidades, enfermedad de Castleman multicéntrica, linfoma no Hodgkin y melanoma múltiple⁽¹¹⁾.

En la actualidad, el diagnóstico de infección por HHV-8 puede confirmarse por análisis PCR y mediante inmunoensayos como IFA y ELISA. Sin embargo, el ADN del HHV-8 solo puede detectarse en las células sanguíneas periféricas de la mitad de las personas infectadas usando ensayos PCR estándar⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Dado que los sistemas de detección PCR parecen presentar un nivel de sensibilidad muy bajo cuando se usa ADN de células sanguíneas periféricas, los ensayos serológicos han demostrado ser más útiles para los estudios epidemiológicos y el diagnóstico de la infección por HHV-8, en especial para la detección de una exposición anterior al virus^(11,12). Los estudios serológicos han detectado anticuerpos específicos frente a HHV-8 en el 80 - 97% de los pacientes VIH positivos con KS, el 54 - 100% de los pacientes VIH positivos que desarrollaron KS antes de transcurridos 5 años desde la recolección de las muestras, y el 16 - 56% de los pacientes que no desarrollaron KS⁽¹³⁾. Por el contrario, la técnica PCR detectó HHV-8 en únicamente el 40 - 50%, el 30% y el 5-10%, respectivamente, de los mismos grupos de pacientes.

El kit HHV-8 de Biotrin se basa en una línea celular que expresa un antígeno lítico que permite la detección de anticuerpos frente a proteínas virales líticas.

Varios fármacos anti-herpesvirus, como ganciclovir, han demostrado poseer actividad contra HHV-8 *in vivo*, pero sólo se dispone de datos clínicos limitados. Se precisan nuevas investigaciones clínicas con varios muestreos para definir las variaciones en los niveles de anticuerpos frente a HHV-8 y para relacionar esos datos con la infección por HHV-8 y los estados de la enfermedad, como KS.

Principio del ensayo

El ensayo de inmunofluorescencia indirecta de Biotrin es un método sencillo y rápido para la determinación de la presencia de anticuerpos frente a antígenos líticos de Herpesvirus Humano-8. El ensayo de inmunofluorescencia utiliza el método indirecto de tinción de anticuerpos con fluorescencia. El procedimiento se realiza en dos pasos básicos de reacción:

En el primero, el suero o plasma humano que se va a analizar se pone en contacto con las células fijas infectadas. El anticuerpo, si está presente en la muestra, formará un complejo con el antígeno en el lecho celular. Si la muestra que se examina no contiene anticuerpos frente a ese antígeno en particular, no se formarán complejos y todos los componentes del suero se eliminarán durante el lavado.

El segundo paso implica la adición de un anticuerpo anti-humano marcado con fluoresceína. Si el anticuerpo frente al HHV-8 está presente (reacción positiva), se observará una fluorescencia brillante de color verde manzana en el microscopio de fluorescencia.

Precauciones

Seguridad

- Solamente para uso *in vitro*.
- Este kit se ha diseñado para ser utilizado exclusivamente por personal de laboratorio cualificado.
- El kit contiene materiales de origen humano, que se consideran MATERIAL POTENCIALMENTE BIOPELIGROSO. Los controles se han sometido a pruebas de HBsAg y de anticuerpos frente a VIH 1/2 y HCV, y han dado resultados negativos. Sin embargo, y dado que ningún método de prueba puede ofrecer garantías completas de la ausencia de virus, todos los controles deben tratarse

como potencialmente infecciosos.

- Algunos reactivos contienen tiomersal, que puede ser tóxico si se ingiere.
- Evitar el contacto con el azul de Evans del conjugado de IgG, ya que es un carcinógeno potencial. Si se produce el contacto con la piel, lavar con agua abundante.
- Algunos reactivos contienen azida sódica que puede formar azidas metálicas potencialmente explosivas si se acumula en las cañerías de plomo o cobre. Para su eliminación, los reactivos se enjuagarán con grandes cantidades de agua para evitar la acumulación de azida.
- Desechar todas las muestras clínicas y material infectado o potencialmente infectado de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio. Todos estos materiales deberán manipularse y desecharse como si se tratara de materiales potencialmente biopeligrosos.
- Los residuos de químicos, preparaciones y componentes de kits se consideran material peligroso. Estos materiales deben desecharse de acuerdo con medidas de seguridad establecidas.
- Durante la manipulación de las muestras, usar prendas protectoras, guantes desechables de látex y protección para los ojos. Una vez finalizadas las manipulaciones, lavarse concienzudamente las manos.
- No pipetar materiales con la boca y nunca comer ni beber en la superficie de trabajo del laboratorio.

Procedimiento

Kit de prueba IFA: SÓLO PARA USO EN INVESTIGACIÓN EN LOS EE.UU.

- No utilice el kit ni los reactivos que contiene más allá de su fecha de caducidad.
- No mezcle ni sustituya los reactivos con otros provenientes de kits con diferente número de lote.
- No use muestras o reactivos contaminados.
- Desviarse del protocolo proporcionado puede conducir a la obtención de resultados erróneos.
- Realizar el ensayo fuera de los límites de tiempo y temperatura puede provocar resultados erróneos. Los ensayos que no se mantengan dentro de los límites de tiempo y temperatura establecidos deberán repetirse.
- La solución de lavado precisa agua de alta calidad, destilada o desionizada. El uso de agua de mala calidad o contaminada podría ocasionar interferencias de fondo. Cerciorarse de mezclar concienzudamente la solución de lavado.
- Dejar que todos los componentes se equilibren a temperatura ambiente (20-25°C) antes de usarlos.
- No extraer los portas de su bolsa protectora hasta estar listo para su uso. Al dejar equilibrar los portas a temperatura ambiente antes de abrir la bolsa se protege el contenido de la humedad.
- Evitar exponer los reactivos directamente a la luz solar y/o a temperaturas superiores a 2-8°C durante períodos de tiempo prolongados.
- Evitar la contaminación cruzada al teñir múltiples muestras marcando el espacio entre los pocillos con un lápiz de cera.
- La aplicación de una cantidad excesiva de medio de montaje ocasiona una fluorescencia borrosa.
- Use siempre recipientes de vidrio limpios, de preferencia desechables, para cualquier preparación de reactivos.
- Debe tenerse cuidado de no contaminar los componentes y usar siempre puntas de pipeta nuevas para cada muestra y cada componente.

- No arañar el pocillo con la punta de la pipeta o el goteador.
- Antes de iniciar el ensayo, deberá establecerse un plan de identificación y distribución.

Componentes del kit:

Materiales suministrados

1. Portaobjetos con antígeno HHV-8:

SLIDE

6 x 10 portas de linfocitos humanos con expresión de antígenos líticos frente a HHV-8 en cada pocillo de vidrio. Los portas están listos para usar una vez fuera de su bolsa protectora.

2. Control positivo de IgG frente a HHV-8*:

CONTROL + IgG

1 x 500µl de control positivo de anticuerpo IgG humano frente a HHV-8. Contiene azida sódica. Listo para su uso.

3. Control negativo*:

CONTROL - IgG

1 x 500µl de control negativo de anticuerpo IgG humano frente a HHV-8. Contiene azida sódica. Listo para su uso.

4. Conjugado FITC anti-IgG humana*:

CONJ IgG

1 x 1,8ml de anti-IgG humana (cadena ligera y pesada) inactivado de cabra, conjugado con fluoresceína con contratincción de azul de Evans y rodamina. Contiene azida sódica. Listo para su uso.

5. Medio de montaje:

MM

1 x 2ml de tampón tris-glicerol. Contiene tiomersal (0,01%). Listo para su uso.

6. Tampón de lavado concentrado (PBS):

BUF WASH CONC

3 x sobres. Cada uno de los sobres aluminizados sellados de tampón en polvo es suficiente para preparar un litro de solución tampón de lavado 1x.

7. Secantes para los portaobjetos:

BLT

Los secantes cuentan con orificios para secar el círculo de cera de los portas.

8. Instrucciones de uso:



*Potencialmente biopeligroso

Otros materiales requeridos no suministrados

- Agua destilada o desionizada de alta calidad.
- Pipetas y puntas desechables de precisión de 20µl, 100µl y 200µl.
- Equipo para la recogida de suero.
- Cronómetro.
- Botellas y bandeja de lavado.
- Tubos de ensayo, soportes, pipetas, placas de microtitulación y material de pipeteo de seguridad para hacer diluciones de las muestras.
- Estufa a 37°C.
- Cámara húmeda para incubar los portaobjetos
- Soporte para los portaobjetos y cubeta de tinción para el lavado de los portas.
- Cubiertas de vidrio: 22 x 50mm; grosor nº.1.
- Microscopio de fluorescencia: Para calibrar los controles y el conjugado se utilizó un microscopio equipado como sigue.
- Lente ocular de 10 aumentos.
- Objetivos de 16 o 40 aumentos.
- Iluminador con lámpara halógena de 50W.
- Filtro de excitación FITC KP490.
- Filtro de absorción amarillo K530.
- Filtro de supresión rojo BG38.

La fluoresceína tiene un pico de excitación a 490nm y un pico de emisión a 520nm. El tipo y estado del equipo de fluorescencia que se utiliza en cada laboratorio pueden explicar las diferencias en la reactividad e intensidad de fluorescencia finales.

Conservación y estabilidad

- El kit es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase exterior, siempre que se conserve entre 2 y 8°C. Nota: Los secantes pueden conservarse entre 2 y 25°C.
- Todos los componentes no utilizados deberán devolverse a su lugar de conservación, a una temperatura entre 2 y 8°C, inmediatamente después de su uso.
- El tampón de lavado reconstituido es estable durante cuatro semanas cuando se conserva entre 2 y 8°C.

Recogida y conservación de muestras

- Se obtendrán muestras usando técnicas de laboratorio asépticas. Las muestras pueden conservarse durante una semana como máximo a temperaturas entre 2 y 8°C y durante períodos más prolongados si se conservan a -20°C. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.
- Las muestras pareadas recogidas a lo largo de un periodo de tiempo para demostrar una seroconversión o un aumento significativo del título, se deberán extraer con un intervalo de 7 a 14 días y se conservarán a -20°C. Estas muestras se analizarán simultáneamente.

Preparación de muestras y reactivos

Preparación de los reactivos

Tampón de lavado: Añadir el contenido completo de un paquete de PBS a un litro de agua destilada o desionizada recién preparada. Conservar en un recipiente cerrado limpio, entre 2 y 8°C durante cuatro semanas como máximo. Nota: La adición de las sales mientras se agita el agua facilitará la disolución.

Todos los demás reactivos se suministran listos para su uso, a la concentración de trabajo.

Preparación de las muestras

Prueba cualitativa: Diluir la muestra en tampón de lavado en una relación de 1:64. Preparar todas las diluciones en un volumen mínimo de 0,10ml de tampón de lavado.

Prueba cuantitativa: El "título" de la muestra puede determinarse mediante la preparación de diluciones dobles en serie de la muestra en solución de lavado, comenzando con una dilución 1:64, y añadiendo volúmenes iguales de muestra diluida y tampón de lavado para cada dilución consecutiva hasta que se logre un grado de fluorescencia "+1" (ver el apartado *Interpretación de los resultados*).

Procedimiento del ensayo

Dejar que todos los componentes se equilibren a temperatura ambiente (20-25°C) antes de su uso.

1. Preparación de los portaobjetos

Extraer la cantidad de portas necesarios de su bolsa protectora y marcar el espacio entre los pocillos con un lápiz de cera para evitar la contaminación cruzada. Dispensar una gota (aprox. 20µl) de cada muestra diluida y una gota (aproximadamente 20µl) de los controles positivo y negativo listos para su uso, y una gota de solución de lavado a los pocillos numerados.

Nota: Añadir suficiente volumen para cubrir completamente cada pocillo, pero evitar que se mezclen los contenidos de pocillos adyacentes.

2. Incubación de las muestras

Incubar los portaobjetos en una cámara húmeda durante 30 minutos entre 35 y 39°C.

3. Lavar el portaobjetos

Lavar los portaobjetos por el lateral con un chorro fino de solución de lavado, usando una botella de lavado. Evitar dirigir el chorro a los pocillos. Colocar los portaobjetos en una cubeta de lavado con solución de lavado durante 10 minutos a temperatura ambiente (20 - 25°C) cambiando la solución al cabo de 5 minutos y agitando suavemente. Secar el círculo de cera que rodea los pocillos con los secantes suministrados.

4. Incubación con el conjugado

Aplicar una gota (aproximadamente 20µl) del conjugado listo para su uso a cada pocillo de ensayo. Incubar los portaobjetos en una cámara húmeda durante 30 minutos a entre 35 y 39°C.

5. Lavar el portaobjetos

Repetir el paso 3.

6. Aplicar el medio de montaje

Aplicar una pequeña gota del medio de montaje al centro de cada pocillo y colocar encima un cubreobjetos.

7. Examinar el portaobjetos

Examinar con un microscopio de fluorescencia de entre 200 y 500 aumentos. Para obtener los mejores resultados, examinar los portas inmediatamente después de terminar la prueba (para obtener resultados equivalentes, sellar los portas o mantenerlos humedecidos para minimizar la deshidratación del medio de montaje. Conservar en la oscuridad entre 2 y 8°C. Leer antes de transcurridos tres días).

8. Gradación

Una reacción positiva puede dar una intensidad de fluorescencia de muy brillante a débil. Graduar la reacción de fluorescencia de acuerdo con la siguiente escala de intensidad: +4 (brillante), +3 (luminosa), +2 (moderada), +1 (débil).

Interpretación de los resultados

Reacción negativa

Se considerará que una muestra es negativa para anticuerpos IgG frente a HHV-8 si no existe fluorescencia tras la tinción de las células infectadas.

Reacción positiva

- Con el antígeno lítico, la célula completa, tanto el citoplasma como el núcleo, serán fluorescentes.
- La muestra podrá considerarse IgG anti-HHV8 positiva si las células presentan tinción fluorescente en una dilución $\geq 1:64$ y el patrón de tinción es similar al del control positivo. Las células de color verde apagado que no presenten una apariencia similar a la del control positivo se considerarán negativas.

+4 = Fluorescencia verde brillante que indica una respuesta a un título muy elevado de anticuerpos IgG frente a HHV-8.

+3 = Fluorescencia verde luminosa que indica una respuesta a un título elevado de anticuerpos IgG frente a HHV-8.

+2 = Fluorescencia verde que indica una respuesta a un título medio de anticuerpos IgG frente a HHV-8.

+1 = Fluorescencia verde apagada que indica una respuesta a un título débil de anticuerpos IgG frente a HHV-8. Esto indica también la dilución final o "título" de la muestra.

- La titulación de las muestras IgG anti-HHV-8 positivas proporciona información cuantitativa. En una serie de titulación, la dilución más elevada del suero que muestre una reacción 1+ se considera la dilución final.
- Para proporcionar un control interno, cada pocillo del porta contiene células infectadas y no infectadas por HHV-8 Este tipo de preparación del portaobjetos es intencional. Las células no infectadas, teñidas de rojo por la contratinción, proporcionan un fondo de contraste.

Significado de la interpretación

No hay fluorescencia de células infectadas en la dilución de cribaje.	La muestra es negativa para anticuerpos IgG del HHV-8.
Células verdes al azar, sin fluorescencia discernible de las células infectadas.	La muestra es negativa para anticuerpos IgG del HHV-8.
Células infectadas cuya reacción no se considera como mínimo +1.	La muestra no es reactiva y se considera negativa para anticuerpos IgG del HHV-8.
Se encuentra fluorescencia positiva específica de células infectadas a la dilución de cribaje o a diluciones más elevadas.	La muestra es positiva, indicando infección previa por HHV-8. La seroconversión o un incremento del cuádruple o superior en el título de anticuerpos IgG en las muestras de suero pareadas indican una infección reciente por HHV-8.
Fluorescencia en células infectadas y no infectadas.	La muestra presenta una reacción no específica.

Criterios de control de calidad

Cada ensayo debe incluir el control positivo, el control negativo y un pocillo de blanco que contenga exclusivamente solución de lavado. Los resultados de un ensayo se consideran positivos si se cumplen los criterios siguientes:

1. El control IgG HHV-8 positivo suministrado con el kit presenta una fluorescencia con una intensidad de $\geq +2$.
2. El control IgG HHV-8 negativo suministrado con el kit no presenta fluorescencia visible.
3. El pocillo que contiene exclusivamente solución de lavado no presenta fluorescencia visible.

Nota: El pocillo que contiene solución de lavado actúa como control del conjugado, para cerciorarse de que el conjugado no reacciona con las células.

Si estos criterios no se cumplen, el ensayo se considerará inválido y deberá repetirse.

Valores esperados

Seroprevalencia

La prevalencia de la enfermedad se determina habitualmente después de un análisis amplio de los niveles de anticuerpos en una población dada, según su edad, sexo, área geográfica y situación socioeconómica.

La seroprevalencia del HHV-8 entre donantes de sangre varía entre el 5 y el 10% en los EE.UU. y el norte de Europa⁽⁴⁾, entre el 10 y el 35% en Italia y los países mediterráneos⁽⁵⁾, y sobrepasa el 50% en muchas poblaciones africanas⁽⁶⁾.

Limitaciones de uso

- Las pruebas serológicas, como la IFA, sirven como complemento a la detección de la infección viral, pero no se utilizarán como único criterio. Los resultados de la prueba deben compararse con el perfil clínico y epidemiológico del paciente, y con los resultados de otras pruebas de laboratorio.
- Un único resultado positivo frente a anticuerpos de IgG de HHV-8 es significativo únicamente porque es indicativo de contacto o infección previos con el virus. Un único resultado resulta útil para fines epidemiológicos. Sin embargo, no debe considerarse indicativo de infección presente o reciente con el virus. Para determinar una infección activa o reciente, se procederá al análisis simultáneo de muestras apareadas de plasma o suero tomadas con entre 7 y 14 días de diferencia. Un incremento del cuádruple o superior de la titulación entre la primera y la segunda muestra será indicativo de una infección presente o reciente.
- En el estudio realizado por Biotrin, se observaron reacciones positivas no específicas en muestras de pacientes con ciertas enfermedades autoinmunes, como anticuerpo antinuclear (ANA). Tanto las células infectadas como las no infectadas presentarán fluorescencia, enmascarando una posible reacción positiva frente a HHV-8. Por lo tanto, la observación de una reacción autoinmune no puede eliminar la posibilidad de una infección por HHV-8. En la prueba del anticuerpo lítico, existe la posibilidad de que una reacción positiva frente a ANA se confunda con una reacción positiva frente a anticuerpo lítico. La comparación de las lecturas de una muestra con ANA con la reacción del control positivo podría ser útil para descartar falsos positivos.

Características de rendimiento

Sensibilidad y especificidad

Sensibilidad para el diagnóstico

Para estudiar la sensibilidad de la prueba frente a los anticuerpos IgG del HHV-8, se tomaron 33 muestras de un conjunto de muestras positivas y se analizaron con IFA para IgG del HHV-8 de Biotrin. Las 33 muestras resultaron positivas, indicando una sensibilidad del 100%. El conjunto de muestras positivas se verificó con otro ensayo disponible comercialmente.

% Sensibilidad = Positivos auténticos/(Positivos auténticos + Falsos negativos + Dudosos) x 100 :

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

Sensibilidad = 100%

Especificidad del diagnóstico

La especificidad del IFA para IgG del HHV-8 de Biotrin se evaluó analizando 122 muestras negativas. La negatividad de estas pruebas se verificó mediante el IFA para IgG del HHV-8 de Biotrin y otros dos ensayos comercialmente disponibles usando la regla dos de tres. De las 122 muestras, 114 resultaron negativas y 8 positivas. Se obtuvo una especificidad del 94% basándose en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ especificidad} = \frac{\text{Negativos auténticos}}{(\text{Negativos auténticos} + \text{Falsos positivos} + \text{Dudosos})} \times 100 :$$

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

Especificidad = 94%

Reactividad cruzada

Para establecer la especificidad del IFA para IgG del HHV-8 de Biotrin se analizaron 42 muestras de suero. La tabla siguiente presenta un resumen de las muestras usadas, procedentes de pacientes con las enfermedades que se detallan a continuación:

Tabla 1

Virus	IFA para IgG del HHV-8 de Biotrin
Lyme	0/3
Virus linfotrópico de células T humanas (HTLV)	0/2
Anticuerpo antinuclear (ANA) ¹	3/3
IgG HHV-6	0/3
VIH-1	0/9
Hep C	0/2
Hep B	0/2
Citomegalovirus (IgG CMV)	0/4
Virus Epstein Barr (EBV)	0/2
Virus herpes simplex (HSV)	0/3
Virus varicela zoster (VZV)	0/2

¹ Reacción cruzada (ver el apdo. *Limitaciones de uso*)

Interferencias (especificidad analítica)

Los estudios de interferencias incluyeron pruebas de hemólisis, bilirrubina y factor reumatoide.

Se observó alguna fluorescencia inespecífica. Sin embargo, ésta no interfirió con la interpretación de la intensidad de la fluorescencia de los resultados positivos. Se percibió una contratinción rojo ladrillo en todos los portas teñidos.

Reproducibilidad

Reproducibilidad interna del ensayo

Los resultados recogidos a continuación se obtuvieron al analizar un control de solución de lavado y muestras con titulación de IgG media y elevada, en 20 ocasiones, con tres lotes de producción diferentes, el mismo día.

Tabla 2

Controles	Lote 1	Lote 2	Lote 3
CP	3+/4+	3+-4+	4+
CN	0	0	0
Solución de lavado	0	0	0
ELEVADA	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+
MEDIA	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+

Reproducibilidad entre ensayos

Los resultados recogidos a continuación se obtuvieron al analizar los controles del kit, un control de tampón de lavado y muestras de suero con titulación de IgG media y elevada, con tres lotes de producción, en diez días diferentes.

Tabla 3.

Lote 1

Muestras	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	Ensayo 7	Ensayo 8	Ensayo 9	Ensayo 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
Solución de lavado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Elevada	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
Elevada	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+	4+	3+/4+
Media	1+/2+	2+	2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	2+	1+	1+/2+	1+
Media	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+
Negativa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 3b

Lote 2

Muestras	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	Ensayo 7	Ensayo 8	Ensayo 9	Ensayo 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
Solución de lavado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Elevada	3+/4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
Elevada	4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+	3+/4+
Media	2+	2+	1+/2+	2+	2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	2+
Media	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+
Negativa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 3c

Lote 3

Muestras	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5	Ensayo 6	Ensayo 7	Ensayo 8	Ensayo 9	Ensayo 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
Solución de lavado	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+
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+
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

* Se incluyó un título del control positivo con una dilución 1:256 en tampón de lavado.

Resumen del procedimiento IFA para IgG del HHV-8

Nota importante:

Leer en su totalidad las instrucciones de uso del producto antes de comenzar el ensayo. Este resumen se suministra únicamente a título informativo

Prueba cualitativa: Diluir la muestra del paciente 1:64 con tampón de lavado.

Titulación cuantitativa: Comenzar con una dilución 1:64 de la muestra en tampón de lavado; a continuación, añadir volúmenes iguales de muestra diluida y solución de lavado por cada dilución consecutiva.



Añadir ~20µl de control positivo al pocillo nº1 del porta
Añadir ~20µl de control negativo al pocillo nº2 del porta
Añadir ~20µl de solución de lavado al pocillo nº3 del porta
Añadir ~20µl de muestra diluida a los pocillos restantes (una muestra por pocillo)



Incubar el porta a 35-39°C durante 30 minutos.



Lavar el porta con tampón de lavado.



Añadir ~20µl (una gota) de conjugado a cada pocillo



Incubar el porta a 35-39°C durante 30 minutos.



Lavar el porta con tampón de lavado.



Colocar 10µl de medio de montaje en cada pocillo y añadir el cubreobjetos



Examinar el porta con un microscopio de fluorescencia

Bibliografía

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.

Interpretación de los símbolos

Material para diagnóstico médico *in vitro*

IVD

Lote

LOT

Referencia de catálogo

REF

Limitación de temperatura



Fecha de caducidad



Fabricante



Nocivo si se ingiere. En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos



Instrucciones de uso



Otros productos Biotrin

Biotrin International ofrece una gama única de ensayos para herpesvirus humano adecuados para la realización de pruebas diagnósticas de laboratorio de rutina.

Cat #:	Description	No of tests
V3HHV6	Human Herpesvirus-6 IgG IFA	4x10 well slides
V17HHV6	Human Herpesvirus-6 IgM IFA	4x10 well slides
V15HHV6	Human Herpesvirus-6 IgG EIA	96 well plate EIA
V18HHV8	Human Herpesvirus-8 IgG IFA	6 x10 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 más información sobre este producto o cualquier otro producto Biotrin,
 por favor visite nuestra pagina Web
www.biotrin.com**