

FRANÇAIS

Référence catalogue: V18HHV8
Nombre de test: 6x10 well slides
HHV-427-03



**Virus de l'Herpès Humain-8
IgG IFA**

Test d'immunofluorescence pour la détection de l'antigène Lytique des IgG dirigées
contre le Virus de l'Herpès Humain de type-8.



TABLE DES MATIERES

Objet

Introduction

Principe du Test

Précautions d'emploi

Sécurité

Procédure

Composition du coffret

Matériel fourni

Matériel nécessaire non fourni

Conditions de conservation et stabilité

Prélèvement et conservation des échantillons

Préparation des échantillons et des réactifs

Mode opératoire

Interprétation des résultats

Contrôle de qualité

Valeurs théoriques

Limites du test

Performances du test

Résumé du mode opératoire du test HHV-8 IgG IFA

Bibliographie

Signification des symboles

Autres produits de Biotrin

Objet

Le test d'immunofluorescence indirecte (IFA) pour la recherche des anticorps dirigés contre le virus de l'Herpès Humain de type 8 (HHV-8) est conçu pour la détermination qualitative et semi-quantitative des IgG anti-antigènes lytiques du HHV-8 dans du sérum ou du plasma humain. La détection des IgG anti-HHV-8 chez l'homme peut servir à poser le diagnostic d'infection primaire ou de réactivation / réinfection par ce virus.

Introduction

Le HHV-8, connu aussi sous le nom de virus de l'Herpès associé au sarcome de Kaposi (SKHV), a été découvert en 1994 quand Chang *et al.* ont identifié deux fragments d'ADN ressemblant à celui du virus de l'Herpès dans les lésions d'un patient ayant un sarcome de Kaposi associé au SIDA⁽¹⁾. Le virus fait partie de la classe gamma des virus de l'Herpès (genre rhadinovirus) et il ressemble à l'EBV quant à son tropisme pour les lymphocytes B et à son aptitude à exister à l'état latent. Il y a maintenant une très forte évidence épidémiologique de l'implication de HHV-8 dans la pathogenèse du Sarcome Kaposi (SK). Le HHV-8 est détectable dans toutes les formes de la maladie: le SK classique (une malignité rare se manifestant chez les hommes âgés d'origine méditerranéenne), le SK endémique africain, le SK associé aux greffes et le SK associé au SIDA.

La transmission par contact sexuel joue un rôle important dans la propagation du HHV-8 parmi les homosexuels⁽²⁾. Toutefois, le HHV-8 peut également être transmis par la salive et des organes greffés⁽³⁾.

Il a été rapporté dans la littérature scientifique que la séroprévalence du HHV-8 dans la population générale varie entre 5 et 35%, en fonction du type de test immunologique utilisé et de la région géographique concernée. Dans un certain nombre d'études rapportées, on a remarqué que les titres d'IgG étaient très élevés chez des patients avec SK mais non chez les donneurs normaux. Ainsi, la séroprévalence du HHV-8 diffère de celui des virus EBV, HHV-6, HHV-7, CMV ou HSV-1 car plus de 80% de la population possède des anticorps dirigés contre ces virus.

La séroprévalence du HHV-8 parmi les donneurs de sang se situe entre 5 et 10% aux Etats-Unis et en Europe du Nord⁽⁴⁾, entre 10 et 35% en Italie et dans les pays méditerranéens⁽⁵⁾, et elle atteint plus de 50% dans de nombreuses populations africaines⁽⁶⁾.

On pense qu'il existe un lien entre la prévalence des anticorps anti-HHV-8 dans la population générale et la fréquence du SK après transplantation⁽⁷⁾. La transmission entre l'allogreffe d'un donneur et le receveur a aussi été documentée. En raison de l'association du HHV-8 et des greffés, il a été recommandé que les donneurs et les receveurs d'organes soient testés pour détecter la présence éventuelle d'anticorps anti-HHV-8^(8,9). Chez les patients séropositifs, il a été montré que les anticorps anti-HHV-8 précèdent et prédisent le développement du SK⁽¹⁰⁾. Le SK est le néoplasme le plus courant dans ce groupe de patients. Le HHV-8 a aussi été associé aux lymphomes des cavités du corps, la maladie multicentrique de Castleman, le lymphome non-Hodgkinien et le myélome multiple⁽¹¹⁾.

A présent, le diagnostic d'infection à HHV-8 peut être confirmé par PCR et par des tests immunologiques tels l'IFA et l'ELISA. Cependant, on ne peut détecter l'ADN du HHV-8 dans les globules du sang périphérique que chez environ la moitié des personnes infectées en utilisant les tests ACP (Amplification en Chaîne Polymérase) normaux⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Alors que les systèmes de détection ACP semblent se montrer peu sensibles en utilisant l'ADN de globules du sang périphérique comme matrice, les tests sérologiques se sont avérés plus utiles pour les études épidémiologiques et le diagnostic de l'infection à HHV-8, en particulier lorsqu'on cherche à savoir si le patient a déjà été exposé au virus^(11,12). Des études sérologiques ont détecté des anticorps spécifiques du HHV-8 chez 80 à 97% des patients séropositifs avec SK, chez 54 à 100% des patients séropositifs qui ont développé le SK dans les 5 années suivant le prélèvement de l'échantillon et chez

16 à 56% des patients n'ayant pas développé le SK⁽¹³⁾. Par contre l'ACP n'a détecté le HHV-8 que chez 40 à 50%, 30% et 5 à 10% des mêmes groupes de patients, respectivement.

Le kit HHV-8 de Biotrin a pour base une lignée cellulaire qui exprime l'antigène lytique, permettant ainsi de détecter les anticorps dirigés contre les protéines virales lytiques.

Plusieurs médicaments anti-herpès, tels que le ganciclovir, se sont avérés agir contre le HHV-8 *in vivo*, mais on ne dispose que de données cliniques limitées. Il est nécessaire de faire une recherche clinique plus approfondie sur plusieurs spécimens sanguins pour définir l'augmentation et la réduction des taux d'anticorps anti-HHV-8 afin d'établir un lien entre ces informations et l'infection à HHV-8 et des états pathologiques comme le SK.

Principe du Test

Le test basé sur le principe d'immunofluorescence indirecte de Biotrin est une méthode simple et rapide servant à détecter les anticorps dirigés contre les antigènes lytiques de l'HHV-8. Le test fluorescent des anticorps utilise la méthode indirecte de coloration fluorescente des anticorps. La procédure se déroule en deux étapes durant lesquelles se produisent des réactions fondamentales:

A la première étape, le sérum ou le plasma humain à tester est mis au contact de cellules infectées fixées. En présence des anticorps dans l'échantillon testé, un complexe avec l'antigène se forme dans le substrat cellulaire. Si l'échantillon examiné ne contient pas d'anticorps dirigés contre cet antigène particulier, aucun complexe ne se forme et tous les constituants du sérum seront éliminés durant le cycle de lavage.

A la deuxième étape, on ajoute des anticorps anti-humains marqués à la fluorescéine. En présence d'anticorps anti-HHV-8 (réaction positive), on peut voir une fluorescence vert pomme brillant sous un microscope à fluorescence.

Précautions d'emploi

Sécurité

- Pour usage diagnostique *in-vitro* seulement.
- Ce coffret doit être uniquement utilisé par le personnel de laboratoire qualifié.
- Ce kit contient des substances d'origine humaine, qui sont considérées comme des SUBSTANCES POUVANT PRESENTER UN RISQUE BIOLOGIQUE. Les témoins et contrôles ont été testés et trouvés négatifs pour HBsAg et pour les anticorps-anti HIV 1/2 et HCV. Toutefois, comme aucun test ne peut fournir une garantie totale, ces produits sont considérés comme potentiellement infectieux.
- Certains réactifs contiennent du Thiomersal, qui peut se révéler toxique à l'ingestion.
- Eviter le contact avec le bleu d'Evans car c'est un carcinogène potentiel. En cas de contact avec la peau, rincer à grande eau.
- Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium qui peut former des azides métalliques potentiellement explosifs dans les tuyauteries en plomb ou en cuivre. Pour les éliminer, ces réactifs devront être rincés avec de grands volumes d'eau pour éviter l'accumulation d'azide.
- Eliminer tous les échantillons cliniques ainsi que le matériel contaminé ou potentiellement contaminé en accord avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire. Tout élément doit être manipulé et éliminé comme potentiellement infectieux.
- Tous les résidus de réactifs, préparations ou produits chimiques doivent être considérés comme dangereux. Il est indispensable de les éliminer selon les procédures standard de sécurité.
- Porter des vêtements de protection, des gants jetables stériles en latex, et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons et de la réalisation du test. Se laver les mains après l'utilisation des réactifs.
- Ne pas pipeter avec la bouche, et ne jamais manger ou boire sur la paillasse de laboratoire.

Procédure

- Ne pas utiliser le kit ou les réactifs après la date de péremption.
- Ne pas mélanger ou remplacer des réactifs provenant de lots différents.
- Ne pas utiliser des échantillons ou des réactifs contaminés.
- Le non-respect du protocole risque de donner des résultats erronés.
- La réalisation du test sans le respect des températures et temps indiqués peut conduire à des résultats erronés. Dans ce cas, le test devra impérativement être répété.
- De l'eau distillée ou désionisée de bonne qualité est nécessaire pour obtenir un bon tampon de lavage. L'utilisation d'eau de mauvaise qualité ou contaminée peut entraîner un bruit de fond élevé à la lecture des résultats.
- Attendre que tous les réactifs soient à température ambiante (20-25°C) et bien les mélanger avant utilisation.
- Ne sortir les lames de leur pochette individuelle qu'au moment de les utiliser. Attendre que les lames soient à température ambiante avant d'ouvrir leur pochette de protection pour éviter toute condensation.
- Eviter de laisser les réactifs à la lumière directe du soleil et/ou à des températures dépassant 2-8°C de façon prolongée.
- Lors de la coloration de plusieurs échantillons sur une lame, éviter la contamination croisée entre échantillons en faisant un trait de cire entre les puits.
- L'utilisation d'une quantité excessive de milieu de montage peut donner une fluorescence trouble.
- Pour la préparation de tous les réactifs, toujours utiliser du matériel en verre propre et de préférence à usage unique.
- Eviter toute contamination inter-réactif et inter-puit et toujours utiliser des embouts de pipette neufs pour chaque échantillon et composant.
- L'ajout de réactif doit se faire au centre du puits, en prenant soin de ne pas érafler les côtés du puits avec le cône.
- Etablir un plan d'identification et de distribution avant de commencer la manipulation.

Composition du coffret

Matériel fourni

1. Lames contenant les antigènes HHV-8 :

| |
|--------------|
| SLIDE |
|--------------|

6 lames à dix puits contenant des lymphocytes humains exprimant les antigènes lytiques du HHV-8 sur chaque puits en verre. Les lames sont prêtes à l'emploi dès ouverture de leur pochette de protection.

2. Contrôle positif IgG HHV-8 *:

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

1 x 500µl de sérum humain contenant des IgG anti-HHV-8. Contient de l'azide de sodium. Prêt à l'emploi.

3. Contrôle négatif *:

| | | |
|----------------|----------|------------|
| CONTROL | - | IgG |
|----------------|----------|------------|

1 x 500µl de sérum humain ne contenant pas d'IgG anti-HHV-8. Contient de l'azide de sodium. Prêt à l'emploi.

4. Conjugué FITC + IgG anti-humaine* :

| | |
|-------------|------------|
| CONJ | IgG |
|-------------|------------|

1 x 1,8ml d'IgG anti-humaine (inactivée) de chèvre conjuguée à de la fluorescéine (chaîne lourde et légère), avec du bleu d'Evans et Rhodamine pour la contre-coloration. Contient de l'azide de sodium. Prêt à l'emploi.

5. Milieu de montage :

MM

1 x 2ml de glycérol avec Tampon Tris. Contient du Thiomersal (0,01 %).
Prêt à l'emploi.

6. Concentré Tampon de Lavage (PBS) :

BUF WASH CONC

3 x sachets en aluminium scellés. Chaque sachet de tampon en poudre permet d'obtenir un litre de tampon de lavage.

7. Buvards pour lames :

BLT

Les buvards absorbants portent des trous prédécoupés permettant de sécher les lamelles.

8. Notice d'utilisation :



***Potentiellement infectieux**

Matériel nécessaire non fourni

- Eau distillée ou désionisée de qualité supérieure.
- Pipettes de précision de 20µl, 100µl et 200µl et embouts jetables.
- Matériel pour prélever les échantillons.
- Chronomètre.
- Pissettes et bac de lavage.
- Eprouvettes, supports, pipettes, plaques de microtitrage et dispositif de pipetage pour diluer les échantillons.
- Incubateur à 37°C
- Chambre humide pour incuber les lames.
- Support de lames et bac de coloration pour laver les lames.
- Lamelles : 22 x 50mm, en verre d'épaisseur No.1.
- Microscope à fluorescence : on a utilisé un microscope à fluorescence muni de ce qui suit pour étalonner les témoins et le conjugué:
- Oculaire x 10.
- Objectifs x 16 ou x 40.
- Epi-illuminateur avec lampe à halogène de 50W.
- Filtre à excitation par la FITC KP490.
- Filtre absorbant le jaune K530.
- Filtre supprimeur du rouge BG38.

La fluorescéine a un pic d'excitation à 490nm et un pic d'émission à 520nm. La différence entre les réactivités des paramètres et les intensités de la fluorescence peut être due au type et à l'état du matériel pour fluorescence utilisé dans votre laboratoire.

Conditions de conservation et stabilité

- Le kit est stable jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette de l'emballage extérieur, à condition d'être conservé entre 2 et 8°C. Remarque : les buvards peuvent être conservés entre 2 et 25°C.
- Remettre tous les réactifs à 2-8°C aussitôt après les avoir utilisés.
- Le tampon de lavage reconstitué est stable 4 semaines à condition d'être conservé à 2-8°C.

Prélèvement et conservation des échantillons

- Prélever les échantillons suivant des techniques biologiques aseptiques. Les échantillons peuvent être conservés 1 semaine à 2-8°C et à -20°C pendant de plus longues périodes. Eviter les cycles répétitifs de congélation/décongélation.
- Prélever des échantillons appariés de sérum/plasma à intervalle (7-14 jours) pour prouver la séroconversion ou une augmentation significative du titre et les conserver à -20°C. Ces échantillons doivent alors être testés simultanément.

Préparation des échantillons et des réactifs

Préparation des réactifs

Tampon de lavage : ajouter tout le contenu d'un sachet de PBS à 1L d'eau distillée ou désionisée fraîchement préparée. Conserver dans un récipient propre fermé à 2-8°C pendant 4 semaines maximum. Remarque : S'assurer que les cristaux de sel sont dissous avant de procéder à la dilution. (Si nécessaire, chauffer doucement le concentré de lavage à 37°C pendant 30 minutes pour dissoudre les cristaux de sel.)

Tous les autres réactifs sont fournis prêts à l'emploi et à la dilution requise.

Préparation des échantillons

Test qualitatif : diluer l'échantillon au 1/64 dans le tampon de lavage. Préparer toutes les dilutions dans du tampon de lavage avec un volume minimum de 0,10ml.

Test quantitatif : le "titre" de l'échantillon peut être déterminé en réalisant une dilution en cascade. A partir de l'échantillon dilué au 1/64ème réaliser des dilutions successives de l'échantillon dans le tampon de lavage, jusqu'à obtention d'un degré de fluorescence de "1+" (cf. Interprétation des résultats).

Mode opératoire

Attendre que tous les réactifs soient à température ambiante (20-25°C) avant de les utiliser.

1. Préparation des lames

Sortir le nombre désiré de lames de la pochette de protection et faire une marque au crayon de cire entre les puits pour éviter la contamination. Distribuer 1 goutte (approximativement 20µl) de chaque échantillon dilué et 1 goutte (approximativement 20µl) des contrôles Positif et Négatif prêts à l'emploi et 1 goutte de tampon de lavage dans des puits numérotés.

Remarque: ajouter suffisamment de volume pour recouvrir complètement chaque puits, mais éviter le mélange croisé du contenu entre puits.

2. Incubation des échantillons

Incuber les lames dans une chambre humide pendant 30 minutes à 35-39°C.

3. Lavage de la lame

A l'aide d'une pissette, rincer les lames le long du bord sous un débit léger de tampon de lavage. Ne pas diriger le jet directement sur les puits. Placer les lames dans une cuvette de rinçage contenant du tampon de lavage pendant 10 minutes à température ambiante (20-25°C), en changeant le tampon de lavage après 5 minutes en agitant doucement. Absorber l'excédent avec les buvards fournis à cet effet.

4. Incubation avec le Conjugué

Placer une goutte (approximativement 20µl) du Conjugué prêt à l'emploi dans chaque puits test. Incuber les lames dans une chambre humide pendant 30 minutes à 35-39°C.

5. Lavage de la lame

Répéter l'Etape 3.

6. Application du milieu de montage

Distribuer une petite goutte (10µl) de milieu de montage au centre de chaque puits et recouvrir d'une lamelle.

7. Examen de la lame

Examiner sous un microscope à fluorescence avec un grossissement de 200-500x. Pour obtenir de meilleurs résultats, examiner les lames immédiatement après avoir terminé le test. (Pour obtenir des résultats équivalents, sceller les lames ou les garder humides pour éviter la déshydratation du milieu de montage. Conserver dans l'obscurité à 2-8°C. Lire le résultat dans les 3 jours).

8. Détermination de l'intensité de réaction

Une réaction positive peut donner une fluorescence plus ou moins intense allant de "brillante" à "terne". Déterminer le degré de la réaction de fluorescence en fonction de l'échelle d'intensité suivante : 4+ (brillante), 3+ (vive), 2+ (modérée), 1+ (faible).

Interprétation des résultats

Réaction négative

Un échantillon est considéré HHV-8 IgG négatif en l'absence de fluorescence des cellules infectées.

Réaction positive

- Pour l'antigène lytique, toute la cellule, le cytoplasme et le noyau seront fluorescents.
- Un échantillon peut être considéré HHV-8 IgG positif si les cellules infectées présentent une coloration vert fluorescent à une dilution $\geq 1/64$ et si le modèle de coloration est analogue à celui du contrôle positif. Les cellules d'un vert terne et dont l'aspect ne ressemble pas à celui du contrôle positif sont considérées "négatives".

4+ = fluorescence vert brillant indiquant un taux très élevé d'IgG anti-HHV-8.

3+ = fluorescence vert vif indiquant un taux élevé d'IgG anti-HHV-8.

2+ = fluorescence verte indiquant un taux moyen d'IgG anti-HHV-8.

1+ = fluorescence vert terne indiquant un faible taux d'IgG anti-HHV-8. Cela indique aussi la dilution de fin de réaction ou le "titre" de l'échantillon.

- Le titre des échantillons HHV-8 IgG positifs apporte des informations quantitatives. Dans une série, la dilution la plus élevée correspondant à une réaction "1+" est considérée comme le titre obtenu de l'échantillon.
- Pour avoir un contrôle interne, chaque puits de la lame de microscope contient à la fois des cellules infectées et non infectées par le HHV-8. Une telle préparation de la lame est volontaire. Les cellules non infectées, colorées en rouge par la contre-coloration, fournissent un contraste en arrière-plan.

Signification de l'interprétation

| | |
|--|--|
| Aucune fluorescence perceptible des cellules infectées n'est observée à la dilution de détection. | L'échantillon testé ne contient pas d'IgG anti-HHV-8. |
| Cellules vertes au hasard ne montrant aucune fluorescence perceptible des cellules infectées. | L'échantillon testé ne contient pas d'IgG anti-HHV-8. |
| Cellules infectées non classées comme ayant une réaction d'au moins 1+. | L'échantillon testé ne réagit pas et il est jugé HHV-8 négatif. |
| Observation d'une fluorescence positive spécifique des cellules infectées à la dilution de dépistage ou pour des dilutions plus élevées. | L'échantillon testé est HHV-8 positif, ce qui indique une infection antérieure à HHV-8. Une séroconversion ou un taux d'IgG dans les échantillons de sérum appariés au moins quatre fois plus important indique une infection récente à HHV-8. |
| Fluorescence observée dans les cellules infectées et les cellules non infectées. | L'échantillon testé a produit une réaction non spécifique. |

Contrôle de qualité

Chaque test doit inclure le contrôle positif, le contrôle négatif et un puits à blanc ne contenant que le tampon de lavage. Les résultats d'un test sont considérés comme valides si les critères suivants sont satisfaits :

1. Le contrôle positif d'IgG anti-HHV-8 fourni avec ce kit donne une fluorescence d'une intensité $\geq 2+$.
2. Le contrôle négatif d'IgG anti-HHV-8 fourni avec ce kit ne donne aucune fluorescence visible.
3. Le puits ne contenant que le tampon de lavage ne donne aucune fluorescence visible.

Remarque : le puits ne contenant que le tampon de lavage sert de conjugué de contrôle afin de garantir que le conjugué ne réagit pas avec le substrat cellulaire.

Si les critères ci-dessus ne sont pas satisfaits, le test est considéré comme non valide et il doit être répété.

Valeurs théoriques

Séroprévalence

Généralement, la prévalence d'une maladie est déterminée après un grand nombre de test réalisé sur une population large en fonction de l'âge, du sexe, de la localisation géographique et du statut socio-économique.

La séroprévalence du HHV-8 parmi les donneurs varie entre 5 et 10% aux Etats-Unis et en Europe du Nord⁽⁴⁾, 10 et 35% en Italie et dans les pays méditerranéens⁽⁵⁾, et atteint plus de 50 % dans de nombreuses populations africaines⁽⁶⁾.

Limites du test

- Un test sérologique comme l'IFA aide à détecter une infection virale, mais son utilisation ne doit pas constituer le seul critère. Les résultats du test doivent être comparés au profil clinique et épidémiologique du patient et aux résultats des autres tests biologiques.
- Un seul résultat positif pour IgG anti-HHV-8 indique que le patient est déjà entré en contact avec le virus ou qu'il est infecté par celui-ci. A des fins épidémiologiques, un seul résultat est utile. Il ne doit toutefois pas être utilisé en tant qu'indication d'une infection actuelle ou récente avec le virus. Pour déterminer une infection actuelle ou récente, il faudra faire des tests simultanés sur des spécimens de plasma ou de sérum appariés prélevés à 7 et 14 jours d'intervalle. Une augmentation du taux au moins quatre fois plus importante entre les deux échantillons indique qu'il y a une infection actuelle ou récente.
- Des réactions positives non spécifiques peuvent se produire dans des échantillons de patients atteints de certaines maladies auto-immunes, par exemple en présence de l'anticorps anti-nucléaire (ANA) et/ou d'anticorps anti-cytoplasmiques . Les cellules infectées et non infectées deviennent toutes fluorescentes, ce qui dissimule une réaction positive à l'HHV-8. L'observation d'une réaction auto-immune ne peut pas exclure la possibilité d'une infection à HHV-8. Avec le test pour anticorps lytiques, il est possible qu'une réaction positive pour l'ANA soit lue comme positive pour les anticorps lytiques. La comparaison entre les résultats obtenus avec un échantillon ANA et le contrôle positif permet d'aider à éliminer les faux-positifs.

Performances du test

Sensibilité et Spécificité

Sensibilité

Pour les IgG anti-HHV-8, 33 échantillons provenant d'un pool connu d'échantillons positifs ont été prélevés et testés avec le test HHV-8 IgG IFA de Biotrin. Les 33 échantillons ont été testés positifs indiquant une sensibilité de 100 %. Le pool d'échantillons positifs a été vérifié avec un autre test commercialisé.

$\% \text{ de sensibilité} = \text{vrais positifs} / (\text{vrais positifs} + \text{faux négatifs} + \text{incertains}) \times 100$

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

Sensibilité = 100 %

Spécificité

La spécificité du test HHV-8 IgG IFA de Biotrin a été évaluée en testant 122 échantillons négatifs. Le test Biotrin a été comparé à deux autres tests commercialisés. Un échantillon a été considéré vrai négatif si deux techniques au moins rendent un résultat négatif. Sur ces 122 échantillons, 114 ont été trouvés négatifs avec le test Biotrin et 8 ont été trouvés positifs. Une spécificité de 94% a été obtenue en se basant sur l'équation suivante:

$$\% \text{ de spécificité} = \text{vrais négatifs} / (\text{faux positifs} + \text{vrais négatifs} + \text{incertains}) \times 100$$

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

$$\text{Spécificité} = 94 \%$$

Réaction croisée

Afin d'établir la spécificité du test HHV-8 IgG IFA de Biotrin, 42 échantillons de sérum ont été analysés. Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus avec des échantillons de sérum prélevés chez des patients ayant les maladies suivantes :

Tableau 1

| Virus | Test HHV8 IgG IFA de Biotrin |
|--|------------------------------|
| Maladie de Lyme | 0/3 |
| Virus du lymphome humain à cellules T (HTLV) | 0/2 |
| Anticorps antinucléaire (ANA) ¹⁻³ | 3/3 |
| IgG HHV6 | 0/3 |
| HIV-1 | 0/9 |
| Hép C | 0/2 |
| Hép B | 0/2 |
| Cytomegalovirus (CMV IgG) | 0/4 |
| Virus Epstein Barr (EBV) | 0/2 |
| Virus de l'herpès simplex (HSV) | 0/3 |
| Virus varicella-zona (VZV) | 0/2 |

¹⁻ Réaction croisée (voir Limites du test).

Interférences (Spécificité analytique)

Les études d'interférence ont inclus des tests pour l'hémolyse, la bilirubine et le facteur rhumatoïde. Un certain degré de fluorescence non spécifique a été remarqué. Cependant, cela n'a pas gêné l'interprétation de l'intensité de la fluorescence pour un résultat positif. Une contre-coloration rouge brique a été remarquée dans toutes les lames colorées.

Reproductibilité

Reproductibilité intra-tests

Les résultats suivants sont obtenus à partir des contrôles du kit, du tampon de lavage et des échantillons à taux élevé et moyen d'IgG. Les dosages sont réalisés 20 fois, le même jour, et avec 3 lots de production différents.

Tableau 2

| Témoins | Lot 1 | Lot 2 | Lot 3 |
|------------------|-------|-------|-------|
| PC | 3+/4+ | 3+/4+ | 4+ |
| NC | 0 | 0 | 0 |
| Tampon de lavage | 0 | 0 | 0 |
| ELEVE | Lot 1 | Lot 2 | Lot 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+ |
| MOYEN | Lot 1 | Lot 2 | Lot 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+ |

Reproductibilité inter-tests

Les résultats suivants sont obtenus à partir des contrôles du kit, du tampon de lavage et des échantillons à taux faible, moyen et élevé d'IgG. Les analyses sont réalisées des jours différents dans dix tests différents et avec trois lots de production.

Tableau 3a

Lot 1

| Echantillons | Test 1 | Test 2 | Test 3 | Test 4 | Test 5 | Test 6 | Test 7 | Test 8 | Test 9 | Test 10 |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| C Pos | 3+/4+ | 3+ | 3+/4+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 4+ | 3+/4+ |
| C Nég | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tampon de Lavage | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Elevé | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ |
| Elevé | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+ | 4+ | 3+/4+ |
| Moyen | 1+/2+ | 2+ | 2+ | 1+/2+ | 1+/2+ | 1+/2+ | 2+ | 1+ | 1+/2+ | 1+ |
| Moyen | 1+ | 1+ | 1+/2+ | 1+ | 1+ | 1+/2+ | 2+ | 1+ | 2+ | 1+ |
| C Pos 1:256* | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ |
| Négatif | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Négatif | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tableau 3b

Lot 2

| Echantillons | Test 1 | Test 2 | Test 3 | Test 4 | Test 5 | Test 6 | Test 7 | Test 8 | Test 9 | Test 10 |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| C Pos | 4+ | 3+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+/4+ |
| C Nég | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tampon de Lavage | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Elevé | 3+/4+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ |
| Elevé | 4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ |
| Moyen | 2+ | 2+ | 1+/2+ | 2+ | 2+ | 1+/2+ | 1+/2+ | 1+/2+ | 1+/2+ | 2+ |
| Moyen | 1+ | 1+ | 1+ | 1+/2+ | 1+ | 1+/2+ | 1+ | 1+ | 1+/2+ | 1+/2+ |
| C Pos 1:256* | 1+/2+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+/2+ |
| Négatif | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Négatif | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tableau 3c

Lot 3

| Echantillons | Test 1 | Test 2 | Test 3 | Test 4 | Test 5 | Test 6 | Test 7 | Test 8 | Test 9 | Test 10 |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| C Pos | 3+ | 3+ | 3+/4+ | 4+ | 3+/4+ | 4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 4+ | 3+ |
| C Nég | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tampon de Lavage | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Elevé | 3+ | 3+ | 3+ | 4+ | 2+/3+ | 3+ | 2+/3+ | 3+ | 3+ | 2+/3+ |
| Elevé | 4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+/4+ | 3+ |
| Moyen | 1+ | 1+ | 1+/2+ | 2+/3+ | 1+/2+ | 1+/2+ | 2+ | 1+/2+ | 2+ | 1+ |
| Moyen | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+ | 1+/2+ | 1+ | 1+ |
| C Pos 1:256* | 2+ | 1+/2+ | 1+/2+ | 2+ | 2+ | 1+/2+ | 1+ | 2+ | 2+ | 1+ |
| Négatif | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Négatif | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

* Un contrôle positif à une dilution de 1/256 dans du tampon de lavage a été inclus.

Résumé du mode opératoire

Remarque importante :
Bien lire toute la notice du produit avant de commencer le test.
Ce résumé n'est qu'un aide-mémoire.

Test qualitatif : diluer l'échantillon du patient au 1/64 ème dans le tampon de lavage

Test quantitatif : commencer avec une dilution au 1/64 ème de l'échantillon dans le tampon de lavage, puis réaliser une dilution en cascade en ajoutant des volumes égaux d'échantillon dilué et de tampon de lavage pour chaque dilution consécutive.



Ajouter ~20µl de contrôle positif dans le puits No. 1 de la lame
Ajouter ~20µl de contrôle négatif dans le puits No. 2 de la lame
Ajouter ~20µl de tampon de lavage dans le puits No. 3 de la lame
Ajouter ~20µl d'échantillon dilué dans les autres puits (un échantillon par puits)



Incuber la lame à 35-39°C pendant 30 minutes



Laver la lame avec le tampon de lavage



Ajouter ~20µl (1 goutte) de conjugué dans chaque puits



Incuber la lame à 35-39°C pendant 30 minutes



Laver la lame avec le tampon de lavage



Placer 10µl de milieu de montage dans chaque puits et ajouter la lamelle



Examiner la lame sous un microscope à fluorescence

Bibliographie

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-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.

HHV-8 IgG IFA, Réf cat: V18HHV8, HHV-427-03 07/09, FR

Signification des symboles

Matériel médical pour le diagnostic *in-vitro*



Référence du Lot



Référence Cat.



Limites de température



Utiliser avant



Fabricant



Nocif si avalé. Le contact avec des acides libère des gaz très toxiques



Notice d'utilisation



Autres produits de Biotrin

Biotrin International offre une gamme unique de tests pour le Virus de l'Herpès Humain (HHV) convenant aux diagnostics biologiques systématiques.

| 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



Si vous souhaitez obtenir de plus amples informations sur ce produit ou sur tout autre produit de Biotrin, rendez-vous sur notre site Web

www.biotrin.com