



## INSTRUÇÕES DE USO

Somente para Uso diagnóstico in vitro

### HERPESVIRUS-6 M

96 testes

Revisão: Maio/2008

#### FINALIDADE DE USO

O Teste Herpesvirus-6 M (HHV-6) destina-se à detecção qualitativa de anticorpos IgM do HHV-6 no soro, como auxiliar no diagnóstico clínico-laboratorial de doentes expostos anterior ou recentemente ao vírus do herpes humano-6.

#### RESUMO E EXPLICAÇÃO

O vírus do herpes humano-6 (HHV-6) foi descrito pela primeira vez em 1986 como um novo vírus de herpes humano, isolado em doentes com desordens linfoproliferativas. Subseqüentemente, o HHV-6, foi confirmado como o agente etiológico da doença infantil exantema súbito (Roséola infantil), e tem sido associado a uma série de outras manifestações patológicas em crianças, incluindo a hepatite fulminante, a encefalite, linfadenite histiocítica necrosante e infecção disseminada fatal.

Nos adultos, a infecção primária por HHV-6 é menos comum, sendo que as provas documentais indicam que o HHV-6 pode estar envolvido em casos de hepatite, doenças do tipo mononucleose, linfoproliferação policlonal atípica, síndrome da fadiga crônica pós-viral, esclerose múltipla, carcinoma oral, carcinoma cervical e supressão da medula óssea em doentes sujeitos a um transplante da medula óssea.

Da mesma forma, o HHV-6, tal como os outros vírus do herpes, pode ficar latente podendo ser reativado após imunossupressão.

Testes virológicos e sorológicos específicos detectaram a presença do HHV-6 na população humana, tendo a infecção ocorrido tipicamente durante os primeiros anos da infância e deixando alguns adultos ainda susceptíveis a infecções primárias. A ocorrência de anticorpos é relatada como superior a 80% em doentes com mais de 2 anos de idade. No entanto, embora a ocorrência de anticorpos do HHV-6 seja elevada, o nível de anticorpos diminui após a infecção, e níveis elevados de anticorpos IgG anti-HHV-6 no soro podem ser um indicador de exposição recente ao HHV-6.

Os anticorpos IgM podem persistir durante meses após a infecção, mas não são normalmente detectados 9 a 12 meses após a mesma. A existência de níveis elevados de anticorpos IgM do HHV-6 no soro pode sugerir exposição recente ao HHV-6 pelo doente ou reativação de uma infecção latente.

#### PRINCÍPIO

O soro contendo anticorpos da classe IgM, quando presentes, combinam-se com o antígeno do vírus do herpes humano-6 incorporados na superfície de poliestireno das microcavidades. O soro residual é removido por meio de lavagem, sendo acrescentada peroxidase conjugada com anti-IgM humana. As microcavidades são lavadas e adiciona-se um sistema de substrato sem coloração, tetrametibenzidina/peróxido de hidrogênio (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O substrato é hidrolisado pela enzima e o cromógeno muda para uma coloração azul. Depois da interrupção da reação com ácido, a TMB torna-se amarela. O desenvolvimento da cor é indicativo da presença de anticorpos IgM HHV-6 na amostra de teste.

#### MATERIAIS FORNECIDOS

1. 12x8 Microcavidades Revestidas com Antígeno do Vírus do Herpes Humano-6. Pronto para uso. As microcavidades não utilizadas devem ser imediatamente seladas novamente e armazenadas com dessecante. Estável a 2-8° C até o término da validade.
2. 1 x 60ml Solução de Tampão Concentrada 20x – Solução tampão salina de fosfato (pH 7,2-7,6) com Tween 20 e conservante (0,1% Proclin). Pode ocorrer cristalização a baixas temperaturas. Para corrigir, incubar a 37° C até ficar límpido. Misturar bem. Diluir uma parte de solução tampão concentrada com 19 partes de água destilada. A solução tampão diluída pode ser armazenada durante uma semana (2-25° C).



3. 1x22ml Diluente de Soro (IgM) – **(Roxo)**. Pronto para uso. Solução tampão salina de Tris (pH 7,2-7,6) com conservante (0,1% Proclin). Estável a 2-8° C até o término da validade.
4. 1x22ml Absorvente do soro- **(Laranja)** Misturar antes do uso. Uma preparação de anticorpos de cabra anti-IgG humanos/Tampão salino Tris (pH 7,2-7,6) com conservante (0,1% Proclin). Estável a 2-8° C até o término da validade.
5. 1x15ml Anticorpo Anti-IgM Humana Conjugada a HRP – **(Amarela)**. Pronto para uso. Anti-IgM humana de ovino/ peroxidase/0,1% de Proclin. Estável a 2-8° C até o término da validade.
6. 1x15ml Tetrametilbenzidina TMB – Pronto para uso. Uma mistura de 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio num tampão citrato /ácido cítrico (Ph 3,5-3,8). Estável a 2-8° C até o término da validade.
7. 1x200µl Controle Positivo –(Tampa Preta) soro humano contendo anticorpos IgM anti-Herpesvirus-6 (contém 0,1% de azida sódica e 0,005% de sulfato de gentamicina). Estável a 2-8° C até o término da validade.
8. 1x400µl Calibrador Cut-Off – (Tampa Laranja) soro humano contendo anticorpos IgM anti-Herpesvirus-6 (contém 0,1% de azida sódica e 0,005% de sulfato de gentamicina). Estável a 2-8° C até o término da validade.
9. 1x200µl Controle Negativo – (Tampa Branca) soro humano não contendo anticorpos IgM anti-Herpesvirus-6 (contém 0,1% de azida sódica e 0,005% de sulfato de gentamicina). Estável a 2-8° C até o término da validade.
10. 1x15ml Solução de Bloqueio – Pronto para uso.Ácido fosfórico 1M. Estável à temperatura ambiente (20-25° C) até o término da validade.

**Proclin 300 é uma marca registrada na Rohm and Haas Company.**

A concentração de azida sódica nestes componentes é classificada como perigosa e sujeita às seguintes frases de risco “Nocivo em caso de ingestão e em contacto com ácidos liberta gás altamente tóxico.”

#### **MATERIAL ADICIONAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO**

- (1) Micropipetadores de precisão com ponteiras de pipetas descartáveis (capacidade 5-1000 µl).
- (2) Água deionizada
- (3) Sistema de lavagem de microplacas
- (4) Leitor de microplacas com filtro de 450nm
- (5) Cronômetro
- (6) Cilindro graduado
- (7) Balão de vidro
- (8) Tubos de ensaio para diluição de soros

#### **PRECAUCÕES**

##### **PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO***

1. Todo o material de origem humana usado na preparação dos controles foi submetido à teste do anticorpo do vírus da imunodeficiência humana I & 2 (HIV I & 2) hepatite C (HCV), assim como para o antígeno de superfície da hepatite B, com resultado negativo. No entanto, nenhum método de teste pode garantir segurança absoluta e todos os controles humanos e cavidades revestidas com antígeno devem ser manuseados como material potencialmente infeccioso
2. Não utilizar soros inativados pelo calor
3. Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente (20-25° C) antes de se iniciar o ensaio. O ensaio é afetado por alterações de temperatura. Não remover as microcavidades do invólucro fechado até estes terem atingido a temperatura ambiente (20-25° C).
4. Administrar os reagentes diretamente dos frascos utilizando ponteiras de pipeta limpas. A transferência de reagentes pode resultar em contaminação.
5. As microcavidades não utilizadas devem ser imediatamente seladas novamente e armazenadas na presença de dessecante. O não cumprimento destas indicações pode originar resultados errôneos.
6. Sistema de substrato:
  - (a) Como a TMB é susceptível a contaminação por íons metálicos, não permitir que o sistema de substrato entre em contacto com superfícies metálicas.
  - (b) Evitar exposição prolongada à luz direta.
  - (c) Alguns detergentes podem interferir com o comportamento da TMB.



- (d) A TMB pode ter uma coloração azul pálida. Isto não irá afetar a atividade do substrato nem os resultados do ensaio.

#### AVISO:

7. Alguns componentes do kit contêm azida sódica que poderá reagir com tubulações de chumbo ou cobre formando compostos de azidas metálicos altamente explosivos. Quando eliminar estes reagentes através de canalizações, deixar fluir água em grande quantidade para evitar a acumulação de azidas no sistema de esgotos.
8. A azida sódica inibe a atividade conjugada. Devem ser utilizadas ponteiros de pipeta limpas para a adição do conjugado de maneira que a azida sódica não seja trazida de outros reagentes.

#### COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Deixar coagular o sangue obtido por venopunctura à temperatura ambiente (20-25° C) e, posteriormente, centrifugá-lo. O soro deve ser separado o mais rapidamente possível e refrigerado (2-8° C) ou armazenado congelado (-20° C) ou a temperaturas mais baixas, se não for testado no intervalo de dois dias. Congeladores com auto descongelamento não são recomendados para o armazenamento. A utilização de soros ictericos ou de soros apresentando hemólise, lipemia ou flora microbiana não é recomendada

#### PROCEDIMENTO DE TESTE

**NOTA. Certificar-se de que todos os reagentes estão equilibrados à temperatura ambiente (20-25° C) antes de se iniciar o ensaio.**

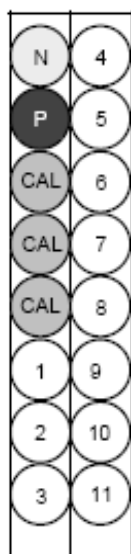
Efetuar o teste fora dos limites de tempo e temperatura indicados pode produzir resultados inválidos. Os ensaios que não tenham sido efetuados dentro dos limites de tempo e temperatura estabelecidos devem ser repetidos.

#### Pré-diluição do soro e Absorção

- Utilizando tubos de ensaio apropriados ou uma placa de microelisa, diluir o controle positivo, o controle negativo, o Cut-Off em triplicata, e as amostras..
  - (a) Adicionar 90 µl de diluente de soro a 10 µl de soro. Misturar bem.
  - (b) A 20 µl de soro diluído adicionar 180 µl de diluente de soros. Misturar bem.

A diluição final do soro absorvido é 1:100

#### PROCEDIMENTO ELISA



1. Retirar da embalagem de alumínio o número necessário de microcavidades e colocá-las no suporte de tiras. São necessários cinco microcavidades: para o controle negativo (N), o controle positivo (P) e o Cut-Off (CO) em triplicata. Certificar-se de que as microcavidades não utilizadas sejam devidamente seladas dentro da embalagem de alumínio.
2. Pipetar 100 µl da amostra retirada do doente, controles e Cut-Off nas respectivas microcavidades.
3. Cobrir a placa e incubar durante 30 minutos a 37° C .
4. Lavar seis (6) vezes com solução tampão diluída (ver o procedimento de lavagem).
5. Pipetar 100 µl de anti-IgM humana conjugada a HRP em cada cavidade.
6. Cobrir a placa e incubar durante 30 minutos a 37° C .
7. Lavar seis (6) vezes com solução tampão diluída (ver o procedimento de lavagem em baixo).
8. Pipetar 100 µl de TMB em cada cavidade.
9. Incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente (20-25° C), contando o tempo desde a primeira adição. Irá formar-se uma cor azul.
10. Pipetar 100 µl de solução de bloqueio em todas as cavidades seguindo a mesma seqüência e contagem de tempo da adição da TMB. Misturar bem. A cor azul mudará para amarela.
11. Dentro de 30 minutos ler a absorbância de cada cavidade com um comprimento de onda de 450nm com um filtro de referencia de 600-650nm.



**Nota.** Se existir um espectrofotômetro de comprimento de onda dupla, ajustar o filtro de referencia entre 600-650nm. A leitura dos microcavidades 450nm sem um filtro de referencia pode resultar em valores de absorbância mais elevados devido ao fundo.

### PROCEDIMENTO DE LAVAGEM

Uma lavagem eficiente para remover amostras ou componentes não combinados é um requisito importante do método ELISA.

#### A. Lavador automático de placas

- 1) Aspirar completamente todas as cavidades.
- 2) Encher todas as cavidades até a borda (350µl) durante o ciclo de lavagem.
- 3) Ao completar 6 lavagens, inverter a placa e bater levemente num papel absorvente para garantir que toda a solução tampão seja removida.
- 4) Os lavadores automáticos de placas devem ser conservados em boas condições para garantir uma lavagem eficiente. As instruções de lavagem do fabricante devem ser sempre respeitadas.

#### B. Lavagem manual

- 1) Jogar fora o conteúdo das placas em um recipiente de resíduos apropriado.
- 2) Encher as cavidades com solução tampão utilizando um frasco apropriado. Evitar fazer espuma na solução tampão, uma vez que pode reduzir a eficiência da lavagem. Jogar fora imediatamente a solução tampão existente nas cavidades.
- 3) Encher novamente as cavidades com solução tampão e remover imediatamente.
- 4) Repetir o passo 3 mais quatro vezes, perfazendo um total de seis lavagens com solução tampão.
- 5) Depois da lavagem final, remover o conteúdo das cavidades e bater levemente a placa num papel absorvente para garantir que toda a solução tampão seja removida.

### CONTROLE DE QUALIDADE

Cada kit contém um calibrador Cut-Off e soros de controle positivo e negativo. Os valores aceitáveis para estes soros são encontrados na folha de aplicação anexa. O teste é inválido e deve ser repetido se as leituras de absorbância dos controles e do calibrador, não corresponderem às especificações. Controles adicionais podem ser testados de acordo com requisições locais ou regulamentações federais.

### CÁLCULOS

**Nota: O fator de calibração é específico e detalhado na folha de especificação que contém dentro do kit. Obtenha o valor do fator da calibração antes de começar os cálculos.**

- (1) Calcular a absorbância média das triplicatas do calibrador Cut-Off. Este é o valor Cut-Off.
- (2) Um valor de índice pode ser calculado dividindo-se a absorbância da amostra pelo valor de Cut-Off (calculado no passo 1 acima).  
OU.,
- (3) As Unidades PANBIO podem ser calculadas multiplicando-se o valor de índice (calculado no passo 2 acima) por 10.

**Valor do índice =  $\frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{valor do cut-off}}$**

Exemplo: Absorbância da amostra A: 0,949  
Absorbância da amostra B: 0,070

Absorbância média do calibrador = 0,802  
Fator de Calibração = 0,62  
Valor Cut-off = 0,802 x 0,62 = 0,497

Amostra A (0,949/0,497) = 1,91 valor do índice  
Amostra B (0,070/0,497) = 0,14 valor do índice

**Unidades Panbio = valor do índice x 10**



Amostra A 1,91 x 10 = 19,1 Unidades PanBio  
Amostra B 0,14 x 10 = 1,4 Unidades PanBio

### INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

ÍNDICE	UNIDADES PANBIO	RESULTADO
< 0,9	< 9	Negativo
0,9 – 1,1	9-11	Duvidoso
> 1,1	> 11	Positivo

### RESULTADO INTERPRETAÇÃO

Negativo	Não há indícios de infecção recente.
Duvidoso	Amostras duvidosas devem ser repetidas.
Positivo	Sugere infecção recente ou reativação.

Nota 1: No caso de não serem detectados anticorpos IgM e IgG específicos e se suspeitar de infecção recente, a confirmação pode ser obtida através de teste de uma outra amostra 7 – 14 dias mais tarde.

Nota 2: No caso de amostras que continuam duvidosas após repetição do teste, deve-se repetir o teste utilizando um método alternativo ou dever-se-á fazer a coleta de outra amostra.

Recomenda-se relatar os resultados obtidos da seguinte forma. “Os resultados que se seguem foram obtidos com o teste Herpesvirus-6 M. Os valores obtidos por métodos diferentes não podem ser utilizados de forma intercambiável. O valor do resultado obtido, acima do Cut-Off, não é indicativo da quantidade total de anticorpos presentes.” O resultado deve ser referido como positivo, negativo ou duvidoso”. O uso combinado do teste HHV-6 ELISA e dados clínicos são recomendados quando o diagnóstico for baseado em amostra única.

### LIMITAÇÕES DO TESTE E VALORES ESPERADOS

1. Este teste deve ser realizado somente em soro. O uso de sangue total ou plasma não foi estabelecido.
2. O uso de soro hemolizado, lipêmico ou com crescimento microbiológico deve ser evitado.
3. A avaliação de anticorpos HHV6 IgM pode ocorrer em pacientes com mononucleose. Nestes casos infecção por EBV e CMV devem ser excluídas.
4. Soro de pacientes com outras hipervirose como EBV, HSV e CMV podem apresentar reação cruzada com o antígeno HHV6 usado neste kit.
5. Soroepidemiologia de uma população pode variar em diferentes regiões geográficas. Qualquer resultado sorológico deve ser interpretado em conjunto com outros dados clínicos e laboratoriais.
6. O diagnóstico clínico deve ser avaliado juntamente com os sinais e sintomas do paciente. Os resultados obtidos a partir deste kit não constituem por si só diagnóstico e devem ser considerados em associação com outros dados clínicos do paciente.
7. Os resultados de doentes imunodeprimidos devem ser avaliados com cautela.
8. A existência de níveis elevados de anticorpos IgM do HHV-6 nos soro pode sugerir exposição recente ao HHV-6 pelo doente ou reativação de uma infecção latente.
9. As características de desempenho não foram estabelecidas para determinação visual do resultado.
10. Um soro que contenha níveis persistentes de IgM deverá ser examinado de forma a excluir outras causas, incluindo reações cruzadas com outros agentes infecciosos.



## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram testados 149 amostras individuais de soro no Panbio Elisa Herpesvirus 6. O painel de soro era constituído de 98 amostras de doadores de sangue australianos e por 51 amostras caracterizadas IgM positivas para o HHV 6 por um IFA interno. Os resultados são apresentados na tabela 1.

**Tabela 1**  
**Panbio ELISA-IgM do Herpesvirus Humano 6 –**  
**Sensibilidade e especificidade contra estado HHV-6**

PANBIO ELISA				
Estado HHV-6	Positivo	Duvidoso <sup>a</sup>	Negativo	Total
Seropositivo (IFA IgM HHV-6)	21	6	13	40
Negativo (dadores de sangue)	8	4	86	98
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>10</b>	<b>99</b>	<b>138</b>

**Sensibilidade serológica** = 21/40 = 52,5%      **IC de 95%** 36,1 – 68,5%  
**Especificidade clínica** = 86/98 = 87,8%      79,6 – 93,5%  
**Concordância relativa** = 107/138 = 77,5%      70,6 – 84,5%

<sup>\*</sup> IC = Intervalo de Confiança

<sup>a</sup> A repetição de testes de amostras duvidosas não foi efectuada, uma vez que as mesmas não existiam.

Nota: sensibilidade e especificidade "serológicas" refere-se à comparação dos resultados do ensaio Panbio aos outros ensaios normalmente utilizados para diagnosticar HHV-6. Não houve uma tentativa de correlacionar os resultados do ensaio com a presença ou ausência de doença. Não é possível fazer qualquer avaliação sobre a precisão da comparação na previsão da doença. Uma vez que os estudos acima mencionados foram conduzidos numa população pré-seleccionada e retrospectiva, não é possível efectuar ou inferir cálculos para o valor de previsão positivo ou negativo do ensaio.

## REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade do Panbio Elisa Herpesvirus 6 foi determinada por três operadores, testando oito soros em triplicata em três dias diferentes. Os resultados estão descritos na tabela 2.



**Tabela 2**  
**Panbio ELISA-IgM do Herpesvírus Humano 6 –**  
**Medições de precisão (utilizando o valor do índice\*)**

Amostra	n	*Média	Dentro da série		Entre dias		Entre Lotes		Total	
			*D.P.	CV	*D.P.	CV	*D.P.	CV	*D.P.	CV
Reactiva	27	1,22	0,12	9,7%	0,06	5,0%	0,09	7,4%	0,15	12,3%
Calibrador	27	0,50	0,04	7,5%	0,00	0,0%	0,00	0,0%	0,03	6,9%
Negativa	27	0,10	0,02	19,5%	0,01	13,2%	0,00	0,0%	0,02	22,3%
n.º 1	27	1,43	0,21	14,8%	0,00	0,0%	0,19	13,0%	0,26	18,1%
n.º 2	27	1,66	0,24	14,3%	0,06	3,8%	0,26	15,8%	0,33	19,7%
n.º 3	27	2,53	0,30	12,0%	0,00	0,0%	0,53	20,8%	0,53	20,9%
n.º 4	27	0,96	0,11	11,3%	0,04	3,7%	0,12	12,7%	0,15	15,8%
n.º 5	27	1,15	0,16	13,6%	0,05	4,5%	0,16	13,9%	0,21	18,2%
n.º 6	27	1,06	0,12	10,9%	0,18	16,7%	0,05	5,0%	0,19	18,1%
n.º 7	27	0,29	0,04	12,7%	0,00	0,0%	0,02	5,5%	0,04	13,1%
n.º 8	27	0,39	0,10	25,7%	0,05	13,7%	0,00	0,0%	0,11	27,3%

Todos os valores foram calculados a partir de Valores de Índice  
(Cut-Off utilizando OD)

DP = Desvio Padrão; CV = Coeficiente de Variação

Nota: os resultados do Desvio Padrão foram arredondados para duas casas decimais por razões de tabulação.

\*O valor de índice é calculado dividindo a absorvância da amostra pelo valor de Cut-Off.

## REAÇÃO CRUZADA

Um painel com 79 amostras de doentes com patologias confirmadas que não correspondem ao HHV 6 foram testadas para estabelecer a especificidade analítica do Panbio Elisa Herpesvirus 6. As amostras pertenciam a doentes que tinham potencial para reação cruzada. Os resultados são apresentados na tabela 3.

**Tabela 3**  
**Panbio ELISA-IgM do Herpesvírus Humano 6 –**  
**Análise à reactividade cruzada**

Tipo de Doença	Total de Amostras	Resultado Positivo
Enterovírus	4	0/4
Vírus Epstein-Barr	10	6/10
Vírus Varicela-zoster	10	4/10
Factor Reumatóide	10	4/10
Anticorpo Antinuclear	10	1/10
Parvovírus	10	2/10
IgM Herpes Simplex	9	1/9
Rubéola	6	2/6
CMV	10	7/10
<b>Total</b>	<b>79</b>	<b>27/79</b>



## GUIA DE RESOLUÇÕES DE PROBLEMAS

PROBLEMA	CAUSA PROVAVEL	SOLUÇÃO
<b>Absorbâncias elevadas</b>	1. Contaminação cruzada de outras amostras.	* Repetir os cuidados ao lavar e ao utilizar as pipetas.
	2. Lavagem ou leitura insuficiente ou ineficaz.	* Verificar a eficácia do lavador – utilize o Kit CHEK Plus .
	3. Comprimento de onda do filtro incorreto.	*Certificar-se de que o comprimento de onda é de 450 nm. Se existir um espectrofotômetro de comprimento de onda dupla, marque o filtro de referência entre 600-650 nm.
	4. Fundo do ensaio.	*Repetir o ensaio incluindo uma cavidade que contenha apenas Diluente de Soro ou absorvente (isto é, uma cavidade em branco).
	5. TMB contaminada (apresenta a cor azul quando é retirada do frasco).	* Certificar-se de que a TMB é incolor.
	6. Tempo de incubação demasiado longo ou temperatura de incubação demasiado elevada.	* Verificar se o incubador está à temperatura correta.
	7. Utilização de reagentes incorretos.	* Certificar-se de que os reagentes usados são os indicados.
<b>Absorbâncias baixas</b>	1. Tempo de incubação demasiado curto ou temperatura de incubação demasiado baixa.	* Verificar o tempo de incubação. * Verificar se o incubador está à temperatura correta.
	2. Diluição ou pipetagem incorreta do soro.	* Repetir o teste certificando-se de que são utilizados os volumes e as diluições corretas. Certificar-se também de que os controles estão suficientemente misturados.
	3. Comprimento de onda do filtro incorreto.	* Verificar se o comprimento de onda está regulado para 450 nm. Se existir um espectrofotômetro de comprimento de onda dupla, ajuste o filtro de referência entre 600-650 nm.
	4. Solução conjugada contaminada.	* Distribuir a solução conjugada diretamente do frasco com uma ponteira de pipeta limpa. * Se possível, evite transferir a solução conjugada para outro recipiente. * Certificar-se de que todas as pipetas utilizadas para a solução conjugada estejam limpas, sem soro ou detergente.
	5. A validade do kit terminou.	* Verifique a data de validade e não utilize caso tenha vencido.
	6. A leitura foi feita contra um branco de ar?	* Ler sempre contra um branco de ar.
	7. Armazenamento incorreto do kit.	* Certificar-se de que o kit é armazenado a 4°C, a placa selada e a embalagem de dessecante está azul/roxa.
	8. Os reagentes do kit não estão à temperatura ambiente.	* Deixar os reagentes atingirem a temperatura ambiente antes do teste ser efetuado.
	9. Utilização de reagentes incorretos.	* Certificar-se de que os reagentes usados são os indicados.
	10. Excesso de lavagem da placa (por ex. demasiado tempo em imersão).	* Repetir a lavagem da placa conforme recomendado.
<b>Duplicatas fracas</b>	1. Amostras mal misturadas.	* Misturar os reagentes cuidadosamente até atingirem a temperatura ambiente.
	2. Pouca precisão da pipeta.	* A calibração deve ser verificada. * Verificar a técnica de pipetagem – certificar-se de que a ponteira da pipeta é trocada entre cada amostra e de que a superfície exterior da ponteira é limpa do líquido em excesso.
	3. Adição de reagentes a intervalos de tempo inconsistentes; tempo de adição de reagentes demasiado longo; formação de bolhas de ar ao adicionar os reagentes.	* Ao adicionar os reagentes seja consistente no “timing” utilizado. * Certificar-se que as diluições estão todas preparadas antes de começar a adicionar à placa; ajustar a velocidade e a técnica de manuseamento da pipeta.
	4. Lavagem ineficaz – solução tampão deixada nas cavidades, lavagem inconsistente, lavagem inadequada.	* Com uma ligeira pancada, jogar fora a solução tampão depois da lavagem. * Verificar se as cavidades estão suficiente e uniformemente cheias e aspiradas quando proceder à lavagem.
	5. Leitor de placas não calibrado ou aquecido antes da leitura da placa.	* Verificar a precisão do leitor utilizando um kit CHEK Plus * Verificar no manual do leitor qual o período de aquecimento do instrumento.

	6. A via óptica não está limpa.	* Limpar cuidadosamente o fundo da placa. * Verificar se a fonte de iluminação do leitor e o detector estão limpos.
	7. Líquido a ser derramado das cavidades.	* Repetir o teste, tendo cuidado para não bater na placa ou derramar líquido.
	8. As amostras de soro apresentam flora microbiana ou lipêmia.	* Não se recomenda a utilização de amostras de soro que apresentem lipêmia ou flora microbiana.
	9. Volumes desiguais das cavidades devido a evaporação.	* Cobrir a placa com uma tampa ou selante de placas (não fornecidos).
<b>Todos as cavidades amarelas</b>	1. TMB contaminada.	* Certificar-se de que a TMB está incolor.
	2. Reagentes contaminados (por ex.: solução conjugada, solução tampão).	* Verificar os reagentes quanto à turvação.
	3. Diluição incorreta do soro.	* Repetir o teste verificando a diluição do soro.
	4. Armazenamento incorreto do kit.	* Certificar-se se o kit está armazenado a 4°C, e a placa selada e embalagem de dessecante está azul/roxa.
	5. Lavagem ineficaz.	Verificar se as cavidades estão suficiente e uniformemente cheias e aspiradas quando proceder à lavagem.
<b>Todos as cavidades negativas</b>	1. O teste não foi corretamente efetuado – os reagentes não foram adicionados ou não foram adicionados na seqüência correta.	* Verificar o procedimento e se foram utilizados reagentes. * Certificar-se de que a solução tampão não foi adicionada antes do conjugado ou do TMB. * Certificar-se de que o soro foi diluído com o diluente correto, ou seja, não utilizar diluente de absorvente para um ELISA-IgG.
	2. Solução conjugada contaminada.	* Retirar o conjugado diretamente do frasco com uma ponteira de pipeta limpa. * Se possível, evitar transferir o conjugado para outro recipiente. * Certificar-se de que todas as pipetas utilizadas para transferir a solução conjugada estão limpas e sem soro, detergente e lixívia.
	3. Excesso de lavagem da placa.	* Repetir a lavagem da placa de ensaio conforme recomendado.
	4. Armazenamento incorreto do kit.	* Certificar-se se o kit está armazenado a 4°C, e a placa selada e embalagem de dessecante está azul/roxa.

## BIBLIOGRAFIA

1. Salahuddin, S. Z., Albashi, D. V., Markham, P. D., Joseph, S. F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., Halligan, G., Biberfeld, P., Wong-Stall, F., Kramarsky, B. and Gallo, R. C. (1986). Isolation of a new vírus, HBLV, in patients with lymphoproliferative Disorders. *Science* **234**: 596-601.
2. Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y. and Kurata, T. (1988). Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for Exanthema subitum. *Lancet* **I**:1065-1067.
3. Asano, Y., Yoshikawa, T., Suga, S., Yazaki, T., Knodo, K. and Yamanishi, K. (1990). Fatal fulminant hepatitis in an infant with human herpesvirus-6 infection. *Lancet* **335**: 862-863.
4. Asan, Y., Yoshikawa, T., Kajita, Y., Ogura, R., Suga, S., Yazaki, T., Nakashima, T., Yamada, A. and Kurata, T. (1992). Fatal encephalitis/encephalopathy in primary Human herpesvirus-6 infection. *Arch. Dis Child.* **67**:1484-1485.
5. Eizuru, Y., Minematsu, T., Minamishima, Y., Kikuchi, M., Yamanishi, K., Takahashi, M. and Kurata, T. (1989). Human herpesvirus-6 in lymph nodes. *Lancet* **I**:40.
6. Prezioso, P.J., Cangiarella, J., Lee, M., Nuova, G. J., Borkowsky, W., Orlow, S. J. and Greca, M. A. (1992). Fatal disseminated infection with human herpesvirus-6. *J. Pediatrics* **120**:921-923.
7. Dubedat, S. and Kappagoda, N. (1989). Hepatitis due to human herpesvirus-6. *Lancet* **2**:1463-1464.
8. Steeper, T. a., Horwitz, C. A., Ablashi, D. V., Salahuddin, S. Z., Saxinger, C., Saltzman, R and Schwartz, B. (1990). The spectrum of clinical and laboratory Findings from Human Herpesvirus-6 (HHV-6) in patients with mononucleosis-like illnesses not resulting from Epstein-Barr virus or cytomegalovirus. *Am. J. Clin. Pathol.* **93**: 776-783.



9. Kruegar, G. R. F., Koch, B., Ramon, A., Ablashi, D.V., Salahuddin, S.Z., Josephs, S. F., Streicher, H.Z., Gallo, R. C. and Habermann, U. (1988). Antibody prevalence To HBLV (human herpesvirus-6, HHV-6) and suggestive pathogenicity in the General population and in patients with immune deficiency syndromes. *J. Virol. Methods* 21:125-131.
11. Buchwald. D., Cheney, P.R., Peterson, D.L., Henry, B., Wormsley, S.D., Geiger, A., Albashi, D. V., Salahuddin, S.Z., Saxinger, C., Biddle, R., Kikinis, B., Jolesz, F.A., Folks, T., Balachandran, N., Peter, J.B., Gallo, R.C. and Komaroff, A. L. (1992). A chronic illness characterized by fatigue, neurologic and immunologic disorders, and active human herpesvirus type 6 infection. *Ann. Intern. Méd.* 116:103-113.
11. Soldan, S. S., Berti, R., Salem, N., Secchiero, P., Flamand, L. Calabresi, P.A., Brennan, M.B., Maloni, H.W., McFarland, H.F., Lin, H. -C., Patnaik, M. and Jacobson, S. (1997). Association of human herpes vírus 6 (HHV-6) with multiple Sclerosis: Increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nature Medicine* 3:1394-1397.
12. Yadav, M., Chandrashekrana, A., Vasudevan, D.M. and Ablashi, D.V. (1994). Frequent Detection of Human Herpesvirus 6 in Oral Carcinoma. *J. Natl. Câncer Inst* 6:1792-1794.
13. Chen, M., Popescu, N., Woodworth, C., Berneman, Z., Corbellino, M., Lusso, P., Albashi, D. V. and DiPaolo, J. A. (1994). Human Herpesvirus-6 infects cervical Epithelial cells and transactivates human papiloma virus gene expression. *J. Virol.* 68:1173-1178.
14. Drobyski, W.R., Dunne, W. M., Burd, E. M, Knox, K. K., Ash, R. C., Horowitz, M. M., Flomberg, N. and Carrigan, D. R. (1993). Human Herpesvirus-6 (HHV-6) Infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: Evidence of a marrow-Suppressive role for HHV-6 in vivo. *J. Inf. Dis.* 167:735-739.
15. Briggs, M., Fox. J. and Tedder, R.S. (1988). Age prevalence of antibody to human herpesvirus-6. *Lancet* i: 1058-1059.
16. CDC-NIH. (1993). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 3<sup>rd</sup> ed. Pp. 9-12. U. S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service.

---

**Data de vencimento, No. de Lote, No. de Registro do**

**Ministério da Saúde e Responsável Técnico: VIDE EMBALAGEM**

**Produzido por:** PANBIO Limited 532 Seventeen Mile Rocks Rd, Sinnamon Park Queensland 4073 Australia

**Importado e distribuído por:** Medivax Indústria e Comércio Ltda

Av Venezuela 3, sala 303 Rio de Janeiro/RJ - CNPJ: 68.814.961-0001-73

---

**Atendimento ao consumidor Tel: (0xx21) 2283-2833**

---

---

**Representante Legal**  
**Ricardo Weizman**

---

**Responsável Técnico**  
**Luciana Poli Fernandes**  
**CRBio- 2 no 21.140/02**