

HHV-6 IgM IFA, N° de catálogo: V17HHV6, HHV-426-03 07/09 PT



**PORTUGUÊS**

Código: V17HHV6  
Formato: 4 x 10 well slides  
HHV-426-03



**Herpesvírus Humano-6  
Ensaio por Imunofluorescência de IgM**

Um ensaio por imunofluorescência para a detecção dos anticorpos IgM do  
Herpesvirus Humano-6



## ÍNDICE

**Indicações de Utilização**

**Introdução**

**Princípio do Ensaio**

**Precauções**

**Segurança**

**Procedimentos**

**Componentes do Kit**

**Materiais Fornecidos**

**Materiais Adicionais Necessários**

**Conservação e Estabilidade**

**Recolha e Conservação de Amostras**

**Preparação do Reagente e da Amostra**

**Procedimento do Ensaio**

**Interpretação de Resultados**

**Significado da interpretação**

**Critérios do Controlo de Qualidade**

**Valores Esperados**

**Limites de Utilização**

**Características de Desempenho**

**Resumo do Procedimento de IFA de IgM HHV-6**

**Referências**

**Interpretação de Símbolos**

**Produtos adicionais de Biotrin**

## Indicações de utilização

O ensaio por imunofluorescência de IgM de HHV-6 da Biotrin é indicado para a detecção qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos anti-humanos IgM de herpesvírus humano-6 (HHV-6) no soro e plasma.

## Introdução

O herpesvírus humano 6 (HHV-6), inicialmente descrito em 1986, foi isolado em doentes com disfunções linfoproliferativas<sup>1</sup>. Posteriormente, confirmou-se que HHV-6 é o agente etiológico responsável pela doença infantil, exantema súbito (Roseola infantum)<sup>2</sup>, e foi associado com várias outras manifestações de doenças em crianças, incluindo hepatite fulminante<sup>3</sup>, encefalite<sup>4</sup>, linfadenite necrotizante histiocitária<sup>5</sup> e infecção fatal disseminada<sup>6</sup>.

Em adultos, a infecção primária com HHV-6 é menos comum, com evidência documentada mostrando que HHV-6 pode estar envolvido em casos de hepatite<sup>7</sup>, doenças semelhantes à mononucleose<sup>8</sup>, linfoproliferação policlonal atípica<sup>9</sup>, 'síndrome da fadiga pós-viral crónica'<sup>10</sup>, esclerose múltipla<sup>11</sup>, carcinoma oral<sup>12</sup>, carcinoma cervical<sup>13</sup> e supressão da medula óssea em doentes de transplante de medula óssea<sup>14</sup>.

Testes específicos virológicos e sorológicos concluíram que HHV-6 é ubíquo na população humana, com a infecção a ocorrer tipicamente durante o princípio da infância deixando poucos adultos susceptíveis a infecção primária. A prevalência de anticorpos é registada como superior a 80% em doentes com idades superiores a 2 anos de idade<sup>15</sup>. No entanto, embora a prevalência de anticorpos de HHV-6 seja elevada, o nível de anticorpos diminui a títulos baixos após a infecção. A detecção de IgM de anti-HHV-6 em seres humanos pode apenas ser usada como ajuda no diagnóstico de infecção primária com este vírus.

## Princípio do Ensaio

O sistema IFA HHV-6 da Biotrin utiliza o método de imunofluorescência indirecta de detecção de anticorpos e determinação do título. O soro do doente ou as amostras de plasma são incubadas com antígeno HHV-6 imobilizado, que foi estabilizado numa lâmina de vidro. Se os anticorpos IgM de HHV-6 estiverem presentes na amostra, forma-se um complexo estável com o antígeno. O anticorpo ligado, reage depois com uma IgM anti-humana, de cabra, conjugada com fluoresceína e este complexo é visualizado com a ajuda de um microscópio de fluorescência. A reacção positiva de anticorpo é indicada pela fluorescência verde brilhante.

## Precauções

### Segurança

- Utilização exclusiva para diagnóstico *in vitro*.
- Este kit destina-se a ser utilizado exclusivamente por pessoal de laboratório qualificado.
- Este kit contém materiais de origem humana, que são considerados com RISCO BIOLÓGICO POTENCIAL. Os controlos foram testados e são negativos para Ag de HBs e anticorpos de HIV 1/2, HTLV-I/II e HCV. No entanto, como nenhum método de teste pode oferecer garantia completa da ausência de vírus, trate todos os Controlos como potencialmente infecciosos.

- Alguns reagentes contêm Tiomersal, que pode ser tóxico se for ingerido.
- Evite contacto com Azul de Evans porque pode ser um carcinógeno potencial. Se ocorrer contacto com a pele, lave com grandes quantidades de água.
- Alguns reagentes contêm azida de sódio, que pode formar azidas de metal potencialmente explosivas com a canalização de cobre e chumbo. Para deitar fora, os reagentes devem ser lavados com grandes quantidades de água para evitar a acumulação de azida.
- Elimine todas as amostras clínicas, substâncias infectadas ou potencialmente infectas, em conformidade com as boas práticas laboratoriais. Todos os materiais devem ser manipulados e eliminados como se fossem potencialmente infecciosos.
- Resíduos de químicos, preparações e componentes de kit são geralmente considerados como lixo perigoso. Todos estes materiais devem ser eliminados de acordo com procedimentos de segurança.
- Use roupas de protecção, luvas descartáveis de látex, e protecção para os olhos ao manipular amostras e ao realizar o ensaio. Lave muito bem as mãos ao terminar.
- Não pipete os reagentes com a boca e nunca beba ou coma, na bancada de trabalho do laboratório.

## Procedimentos

- Não utilize o kit ou reagentes individuais após ter expirado o prazo de validade.
- Não misture nem substitua reagentes de kits de lotes diferentes.
- Não use amostras nem reagentes contaminados.
- Alterações do protocolo dado podem causar resultados erróneos.
- Se o ensaio for feito, fora dos intervalos de tempo e temperatura dados, podem obter-se resultados inválidos. Os ensaios que não se enquadrem dentro dos intervalos de tempo e temperatura dados têm que ser repetidos.
- É necessária água destilada ou desionizada de alta qualidade para o Concentrado de Tampão de Lavagem. A utilização de água de baixa qualidade ou contaminada pode levar a alterações do meio. Certifique-se que o Concentrado do Tampão de Lavagem é muito bem misturado.
- Permita que todos os reagentes atinjam temperatura ambiente (20 -25°C) e agite-os bem antes de utilizar.
- Não retire as lâminas da bolsa de protecção até estarem prontas a utilizar. Deixe que as lâminas atinjam temperatura ambiente antes de abrir a bolsa de protecção que protege o conteúdo de condensação.
- Evite deixar reagentes sob luz solar directa e/ou acima de 2-8°C por períodos prolongados.
- Ao colorir amostras múltiplas numa lâmina evite a contaminação entre as amostras ao marcar os poços com um lápis de cera.
- A aplicação excessiva de Meio de Montagem pode causar indefinição da fluorescência.
- Use sempre utensílios de vidro limpos, preferivelmente descartáveis, para a preparação dos reagentes.
- Deve tomar-se cuidado para não contaminar componentes e pipete sempre com pontas frescas para cada amostra e cada componente.
- Não risque o poço com a ponta da pipeta nem com o conta-gotas.
- Antes de iniciar o ensaio, deve estabelecer-se um plano de identificação e distribuição.

## Componentes do Kit

### Materiais Fornecidos

1. Lâminas de antígeno HHV-6 :

**SLIDES**

4 x 10 lâminas de poços nos quais se estabilizaram linfócitos humanos infectados com HHV-6. As lâminas estão prontas a serem utilizadas após remoção da bolsa de protecção.

2. Controlo Positivo \*\*:

<b>CONTROL</b>	<b>+</b>	<b>IgM</b>
----------------	----------	------------

1 x 0,5ml controlo humano, positivo, para anticorpo de IgM de HHV-6. Contém 0,1% azida de sódio.(Pronto a utilizar) (Tampa azul).

3. Controlo Negativo \*\*:

<b>CONTROL</b>	<b>-</b>	<b>IgM</b>
----------------	----------	------------

1 x 0,5ml controlo humano, negativo, para anticorpo de IgM de HHV-6. Contém 0,1% azida de sódio.(Pronto a utilizar) (Tampa vermelha).

4. Conjugado de fluoresceína\*\*:

<b>CONJ</b>	<b>ENZ</b>	<b>1X</b>
-------------	------------	-----------

1 x 1,5ml IgM anti-humana (inactivada) de cabra conjugada com fluoresceína com contracorantes de Azul de Evans e Rodamina. Contém 0,1% azida de sódio.(Pronto a utilizar) (Tampa Amarela).

5. Meio de montagem:

**MM**

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

6. Concentrado de tampão de lavagem (PBS):

<b>BUF</b>	<b>WASH</b>	<b>CONC</b>
------------	-------------	-------------

1 x Saqueta. O pacote selado a alumínio contém 10 pastilhas de PBS. Cada pastilha reconstitui até 100ml de 1x tampão de lavagem.

7. Absorventes de lâmina:

**BLT**

4 x Absorventes com orifícios previamente cortados para usar na secagem de máscara de lâminas.

8. Instruções de utilização:



### \*\* Material com risco biológico potencial

### Materiais Adicionais Necessários

- Equipamento de recolha de soro.
- Grelha de suporte de lâminas e placa de coloração para lavar as lâminas.
- Água destilada ou desionizada de alta qualidade.

- Utensílios volumétricos de laboratório, limpos.
- Tubos de ensaio ou equivalente para preparação de amostras.
- Provetas graduadas.
- Pipetas, micropipetas e pontas descartáveis, precisas para distribuírem 5µl a 50µl e 50µl a 200µl.
- Cronómetro
- Incubador 35-39°C
- Toalhas de papel ou papel absorvente
- Tubos de diluição e tubos de minicentrifugação (0,5ml)
- Minicentrifugador de bancada
- Tabuleiro de incubação contendo lenços de papel humedecidos
- Garrafas e tabuleiros de lavagem
- Tampas : 22 X 50mm, espessura No.1
- Lápis de cera
- Adsorvente de IgG (comercialmente disponível)
- O microscópio de fluorescência com combinação de filtro adequado para FITC (filtro de excitação de 495nm, filtro de barreira de 515nm), recomenda-se uma fonte de luz de halogénio. O rótulo de fluoresceína tem um pico de excitação de 490 nm e um pico de emissão de 520nm. As diferenças nas reactividades de parâmetros e intensidades de fluorescência podem dever-se ao tipo e condição do equipamento de fluorescência usado no seu laboratório.

### **Conservação e Estabilidade**

- Kit é estável até à data de prazo de validade indicado no rótulo externo da embalagem se for conservado entre 2-8°C. **Nota:** os absorventes de marcadores podem ser guardados entre 2-25°C.
- Todos os componentes não usados devem voltar a ser conservados a temperaturas entre 2-8°C, imediatamente após utilização.
- O tampão de lavagem mantém-se estável durante 4 semanas se for conservado entre 2-8°C.

### **Recolha e Conservação de Amostras**

- As amostras devem ser obtidas usando técnicas assépticas de laboratório. As amostras podem ser conservadas até 1 semana a 2-8°C e a -20°C para períodos mais longos. Deve evitar-se a repetição de congelamento/descongelamento.
- Não utilize amostras excessivamente lipémicas sem delipidizar.
- Não use amostras contaminadas.

## **Preparação do Reagente e da Amostra**

### ***Preparação do reagente***

Prepare o tampão de lavagem ao adicionar 1 pastilha de PBS a 100ml de água destilada ou desionizada, preparada de fresco. Misture para dissolver. Guarde num recipiente limpo, fechado, entre 2-8°C até 4 semanas.

Todos os restantes reagentes são fornecidos, prontos a utilizar, em diluição de trabalho.

### ***Preparação da amostra***

Teste qualitativo: Todas as amostras são previamente tratadas para remover IgG. Adicione 90µl de adsorvente a 10µl de mistura de teste e misture bem. Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugue a 10.000rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante é então adicionado ao poço da lâmina.

O teste semi-quantitativo: o “título” da amostra pode ser determinado ao preparar duas vezes, diluições séricas da amostra em tampão de lavagem, começando com uma diluição de 1:20 da amostra em Adsorvente, e ao adicionar volumes iguais de amostra diluída e tampão de lavagem para cada diluição consecutiva, até se conseguir o grau “+1” de fluorescência (Ver “Interpretação de resultados”).

## **Procedimento do Ensaio**

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

- 1. Preparação da lâmina**  
Retire o número desejado de lâminas da bolsa de protecção e marque o espaço entre os poços com um lápis de cera para evitar contaminação. Distribua 1 gota (aprox. 20µl) de cada amostra diluída de teste, e 1 gota (aprox. 20µl) de Controlos Positivos e Negativos, prontos a utilizar, em poços numerados.  
Nota: Adicione volume suficiente para cobrir cada poço, mas evite misturar o conteúdo entre os poços.
- 2. Incube as amostras**  
Incube a lâmina em câmara de humidade durante 3 horas a 35-39°C.
- 3. Lave a lâmina**  
Lave as lâminas ao longo das bordas, numa corrente leve de tampão de lavagem usando uma garrafa de lavagem. Evite dirigir a corrente para os poços. Coloque as lâminas num tabuleiro de lavagem, contendo tampão de lavagem durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) mudando o tampão de lavagem após 5 minutos. Absorva a máscara de tinta à volta dos poços de teste com os absorventes fornecidos.
- 4. Incube com conjugado**  
Aplique 1 gota (aprox. 20µl) do conjugado pronto a utilizar, a cada poço de teste. Incube as lâminas em câmara húmida durante 30 minutos a 35-39°C.

5. Lave a lâmina.  
Repita a fase 3.
6. Aplicação do meio de montagem  
Aplique 1 gota pequena de meio de montagem ao centro de cada poço e ponha a tampa.
7. Examine a lâmina  
Examine sob um microscópio fluorescente usando ampliação de 200-500x. Para melhores resultados, examine as lâminas imediatamente após acabar o teste (para obter resultados equivalentes, sele as lâminas ou mantenha-as humidificadas para minimizar a desidratação do meio de montagem. Guarde em local escuro entre 2-8°C. Leia dentro de 3 dias).
8. Graduação  
A reactividade positiva pode variar em intensidade de fluorescência de muito brilhante a fraco. Gradue a reacção da fluorescência de acordo com a escala de intensidade seguinte: +4 (muito brilhante), +3 (brilhante), +2 (moderado), +1 (fraco).

## **Interpretação de Resultados**

### ***Reacção negativa:***

Considera-se a amostra negativa para anticorpos IgM de HHV-6 se a marcação fluorescente de células infectadas estiver ausente.

### ***Reacção positiva:***

Denota-se uma reacção positiva de anticorpos HHV-6, apenas quando se observa fluorescência verde brilhante em células infectadas a uma diluição de  $\geq 1:20$ . Uma reacção positiva indica infecção primária por HHV-6.

+4 = Fluorescência verde muito brilhante que indica um título muito elevado de resposta de anticorpos IgM de HHV-6.

+3 = Fluorescência verde brilhante que indica um título elevado de resposta de anticorpo IgM de HHV-6.

+2 = Fluorescência verde que indica um título médio de resposta de anticorpo de IgM de HHV-6.

+1 = Fluorescência verde fraca que indica um título fraco de resposta de IgM de HHV-6. Isto também indica o parâmetro de diluição ou "título" da amostra.

- A titulação de amostras positivas de IgM de HHV-6 proporciona informação quantitativa. Numa titulação de série, a diluição mais elevada do soro, demonstrando uma reacção "+1" é interpretada como parâmetro de título.
- Para conseguir um controlo interno, cada poço na lâmina de microscópio contém simultaneamente células infectadas e não-infectadas por HHV-6. A preparação da lâmina, desta forma é intencional. As células não infectadas, marcadas a vermelho pelo contracorante, proporcionam um fundo de contraste.
- padrão de marcação fluorescente de células infectadas por HHV-6 é variável. Dependendo da fase de infecção da célula, o padrão de fluorescência pode variar de uma pequena porção de células infectadas com reacção de fluorescência, até à célula inteira. A fluorescência pode também variar de granular a homogénea.

### Significado da Interpretação

Não se encontrou fluorescência discernível de células infectadas na diluição de selecção.	A amostra de teste é negativa para anticorpos IgM de HHV-6.
Encontrou-se fluorescência específica positiva de células infectadas na diluição de selecção ou em diluições mais elevadas.	A amostra de teste é positiva para anticorpos de IgM de HHV-6, indicando infecção actual.
Encontrou-se fluorescência tanto em células infectadas como não infectadas	A amostra de teste demonstra uma reacção não-específica.

### Critérios de Controlo de Qualidade

Cada ensaio tem que conter o Controlo Positivo e Negativo. Os resultados de um ensaio são considerados válidos se forem respondidos os seguintes critérios:

- 1) O controlo positivo de IgM de HHV-6, fornecido com este kit produz um intensidade de fluorescência  $\geq +2$  da célula infectada.
- 2) O controlo negativo de IgM de HHV-6 fornecido com este kit não produz fluorescência específica da célula infectada.

Se os critérios acima não forem respondidos, o ensaio é considerado inválido e tem que ser repetido.

### Valores Esperados

A prevalência de anticorpos de HHV-6 é superior a 80% em doentes com mais de dois anos de idade. Embora a prevalência seja elevada, o título de anticorpos de HHV-6 diminui a níveis baixos após infecção. Portanto, um nível mais elevado de IgM pode sugerir uma infecção principal.

### Limites de Utilização

- Um teste sorológico tal como o ensaio de imunofluorescência (IFA) serve como uma ajuda para detectar a infecção viral, mas a sua utilização não deve ser o único critério. Os resultados de teste devem ser comparados com o perfil clínico e epidemiológico além de outros resultados laboratoriais e clínicos.
- As reacções positivas não-específicas tais como anticorpo anti-nuclear, e/ou reacções anticorpo anticitoplasmáticas podem ocorrer em doentes com certas doenças auto-imunes. Tanto as células infectadas como não infectadas fluorescem e podem obscurecer uma reacção positiva. Portanto, a observação de uma reacção auto-imune não pode eliminar a possibilidade de infecção de HHV-6.
- Uma amostra obtida imediatamente no início da infecção pode não conter níveis detectáveis de anticorpos IgM. Se houver suspeita de infecção viral, deve recolher-se outra amostra 7-14 dias mais tarde. A segunda amostra deve ser testada simultaneamente com a primeira para procurar soroconversão ou um

aumento significativo no título viral específico de IgM e IgG. Tanto a seroconversão como um aumento significativo de título indica infecção primária.

- Dada a possibilidade de contaminação do cordão umbilical com IgM materna, é prudente confirmarem-se os resultados de anticorpos IgM virais positivos nas amostras do cordão umbilical ao testar-se uma amostra de seguimento da criança, preferivelmente dentro dos primeiros cinco dias de vida.
- Os anticorpos específicos de IgM são geralmente detectados em doentes com infecção recente primária. Os anticorpos IgM podem ser encontrados em doentes com infecção reactivadas ou secundárias.
- Biotrin recomenda o pré-tratamento de amostras de testes para remover o anticorpo IgG. Esta etapa adicional ajuda a eliminar resultados negativos falsos e resultados positivos falsos. Quando o anticorpo IgG compete com o anticorpo IgM para sítios específicos de ligação, o anti-corpo de IgG pode levar a um resultado negativo falso. Quando o anticorpo IgG forma complexos imunes com o substrato antigénico, podem ligar-se ao factor reumatóide (classe IgM), o anticorpo IgG pode levar a um resultado positivo falso.

## **Características de Desempenho**

### ***Sensibilidade e especificidade***

#### ***Sensibilidade de diagnóstico***

As 9 amostras positivas de IgM de HHV-6 foram testadas ao usar o ensaio por imunofluorescência de IgM de HHV-6 da Biotrin. As 9 amostras testadas positivas indicaram uma sensibilidade de 100%.

$$\% \text{ Sensibilidade} = \frac{\text{Positivos verdadeiros}}{(\text{Positivos verdadeiros} + \text{falsos negativos})} \times 100$$

$$\% \text{ Sensibilidade} = \frac{9}{(9 + 0)} \times 100$$

$$\% \text{ Sensibilidade} = 100\%$$

#### ***Especificidade de diagnóstico***

Testaram-se 77 amostras de soro, provenientes de doadores normais para IgM de HHV-6 usando ensaio por imunofluorescência de IgM de HHV-6 da Biotrin. Encontraram-se 76 negativos para anticorpos de IgM de HHV-6. Obteve-se 99% de especificidade baseada na equação seguinte:

$$\% \text{ Especificidade} = \frac{\text{Negativos verdadeiros}}{(\text{falsos Positivos} + \text{negativos verdadeiros})} \times 100\%$$

$$\% \text{ Especificidade} = \frac{76}{(76 + 1)} \times 100$$

$$\% \text{ Especificidade} = 99\%$$

### **Reactividade cruzada**

Para estabelecer a especificidade do ensaio por imunofluorescência de IgM de HHV-6 da Biotrin, foram testadas 17 amostras de soro. O quadro seguinte resume os resultados as amostras de soro recolhidas dos doentes das seguintes doenças.

<b>Vírus</b>	<b>Número de positivos em IFA IgM HHV-6 da Biotrin</b>
IgM CMV	0/2
IgM EBV	0/5
IgM HSV	0/2
IgM VZV	0/2
ANA	0/2
MCTD	0/2
Lyme	0/2

**Quadro 1:** Total de reactivos cruzados potenciais que não reagiram a anticorpos de IgM de HHV-6.

### **Interferências (Especificidade analítica)**

Os estudos de interferência incluíram testes para hemólise, lipemia, bilirrubina e factor reumatóide. Notou-se um contra-coloração vermelho tijolo em todas as lâminas marcadas e não houve interferência na interpretação da intensidade de fluorescência.

### **Reprodutibilidade**

#### Intra Ensaio

Testou-se uma amostra positiva 15 vezes em 2 lotes separados. Referir-se ao Quadro 2.

<b>Controlos</b>	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>
PC	2+	2+
NC	0	0
PBS	0	0
<b>Amostra Positiva</b>	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>
1	2+	2+
2	2+	2+
3	2+	2+
4	2+	2
5	1+/2+	2+
6	2+	2+
7	2+	2+
8	2+	2+
9	2+	1+/2+
10	2+	2+
11	2+	2+
12	2+	2+
13	2+	2+
14	2+	2+
15	2+	2+

**Quadro 2:** Uma amostra testada 15 vezes em 2 lotes.

### Inter Ensaio

Fez-se um painel de amostras em dez ensaios diferentes de dois lotes separados. Referir-se ao Quadro 3.

#### Lote 1

Amostras	Gradação	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10
PC	2+-4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
NC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Positivo	≥1+	2+	1+	1+/2+	1+/2+	2+	2+	2+	2+	1+/2+	2+
Positivo	≥1+	2+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+/2+	2+
Negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corte	≥1+	1+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+

#### Lote 2

Amostras	Gradação	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10
PC	2+-4+	2+	2+	2+	2+	2+	2+/3+	2+	2+	2+	2+
NC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Positivo	≥1+	2+	2+	2+	1+/2+	1+/2+	2+	2+	2+	2+	2+
Positivo	≥1+	2+	1+/2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
Negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Corte	≥1+	1+/2+	1+	2+	2+	2+	1+/2+	1+/2+	1+/2+	2+	1+/2+

**Quadro 3:** Os resultados mostraram um painel de amostras testadas em dez ensaios de dois lotes diferentes.

### Resumo do Procedimento de IFA de IgM de HHV- 6

**Nota importante: Por favor, leia o folheto de instruções na sua totalidade antes de iniciar este ensaio. Este resumo é apenas para referência rápida.**

Determinação qualitativa: dilua a amostra do doente 1:10 em IgG Adsorvente  
Determinação semi-quantitativa: comece com uma diluição de amostra de 1:20 em IgG Adsorvente, depois adicione volumes iguais de amostras diluídas e tampão de lavagem para cada diluição consecutiva



Adicione 1 gota (~20µl) de controlo positivo para o poço #1 da lâmina  
Adicione 1 gota (~20µl) de controlo negativo para o poço #2 da lâmina  
Adicione 1 gota (~20µl) amostra diluída aos poços restantes (uma amostra por poço)



Incube a lâmina @ 35-39°C durante 3 horas



Lave a lâmina com tampão de lavagem



Adicione 1 gota (~20µl) conjugado a cada poço



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



Lave a lâmina com tampão de lavagem



Coloque 1 pequena gota (~10µl) de meio de montagem em cada poço e coloque a tampa



Examine a lâmina sob um microscópio fluorescente









## Referências

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 virus, 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 exanthem subitum. *Lancet* 1:1065-1067.
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. Asano, 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* 1:40.
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.
10. 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. Med.* 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 virus 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., Chandrashekran, A. Vasudevan, D.M. and Ablashi, D.V. (1994) Frequent Detection of Human Herpesvirus 6 in Oral Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 86:1792-1794.
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 papilloma virus gene expression. *J. Virol.* 68:1173-1178.

HHV-6 IgM IFA, N° de catálogo: V17HHV6, HHV-426-03 07/09 PT

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.

### Interpretação de Símbolos

Dispositivo médico para diagnóstico “ <i>in-vitro</i> ”	
Código de lote	
Número de catálogo	
Limite de temperatura	
Utilize até ao final de	
Fabricante	
Perigoso se engolido. O contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.	
Instruções de utilização	

### Produtos adicionais de Biotrin

Biotrin International oferece uma gama única de ensaios de Herpesvírus Humano para diagnóstico de laboratório de rotina

<b>Cat #:</b>	<b>Description</b>	<b>Assay Format</b>
V17HHV6	Human Herpesvirus-6 IgM IFA	4 x 10 well slides
V3HHV6	Human Herpesvirus-6 IgG IFA	4 x 10 well slides
V15HHV6	Human Herpesvirus-6 IgG EIA	96 well EIA
V18HHV8	Human Herpesvirus-8 IgG IFA	6 x 10 well slides
V19HHV8	Human Herpesvirus-8 IgG EIA	96 well 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](mailto:info@biotrin.ie)  
[www.biotrin.com](http://www.biotrin.com)



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

**[www.biotrin.com](http://www.biotrin.com)**