

# **RUBEOLA IgG AVIDITY**

**EIA WELL**

**REF:K2RGA  
45 TESTES**

**RADIM**

# RUBEOLA IgG AVIDITY

## EIA WELL

REF: K2RGA  
45 TESTES

### REAGENTES DO KIT

REAGENTES	QUANTIDADE 96 TESTES	ESTADO FÍSICO
Microplaca	1 microplaca 96 testes	Pronto para uso
Solução de Lavagem (20X)	1 X 50 ml	Concentrado
Diluyente de Amostra	1 X 20ml	Concentrado
Controle Baixo	1 X 2ml	Liofilizado
Controle Alto	1 X 2ml	Liofilizado
Reagente Dissociante	1 X 10ml	Pronto para uso
Conjugado enzimático	1 X 14 ml	Pronto para uso
TMB	2 X 15 ml	Pronto para uso
Reagente Bloqueador	1X 14 ml	Pronto para uso

## **INSTRUÇÕES DE USO**

### **RUBEOLA IgG AVIDITY**

#### **IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-RUBÉOLA IgG AVIDEZ EM SORO OU PLASMA HUMANO**

#### **SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO**

### **1. APLICAÇÕES CLÍNICAS**

A Rubéola é um Togavirus RNA de forma esférica, de 60 nm de diâmetro. A Rubéola geralmente causa uma doença sem gravidade, deixando o paciente totalmente imunizado. No entanto, quando adquirida durante a gravidez ela pode causar sequelas no feto, especialmente no primeiro período da gestação. Doenças cardiovasculares, surdez, coriorretinite, retardamento mental e no crescimento são alguns dos danos causados pelo vírus no feto.

Um número significativo de mulheres (cerca de 10-20%), se não forem vacinadas, irão chegar à idade fértil sem terem adquirido imunidade contra o vírus da Rubéola. Por essa razão, o diagnóstico de infecção por Rubéola em seu estágio agudo é particularmente importante em mulheres grávidas. É geralmente executado testando-se a presença de anticorpos IgM. Identificar a fase aguda da doença, baseado em uma única amostra pode se tornar difícil, devido tanto à persistência de IgM (geralmente demorado) quanto pela presença de IgM nos casos de infecção de Rubéola assintomática, que não é ameaçadora para o feto. Avaliar a avides do IgG específico demonstrou ser particularmente útil na identificação da infecção primária. De fato, a resposta inicial do anticorpo IgG à infecção é caracterizada por anticorpos com baixa avides, no qual a ligação aos locais do antígeno específico é facilmente dissociada.

### **2. PRINCÍPIO DO ENSAIO**

O presente método se baseia em um ensaio imunoenzimático (ELISA), no qual é permitido que o soro do paciente reaja em duplicata com um revestimento de antígeno de Rubéola de uma microplaca. Após a primeira incubação, seguida pela lavagem da microplaca, os poços replicados são incubados, cada um com uma solução tampão distinta, um dos quais contendo uréia. O reagente uréia causa dissociação da ligação antígeno-anticorpo previamente formada. O grau da dissociação depende da avides dada do anticorpo. Após o ciclo de lavagem, os anticorpos que ainda se encontrarem ligados a fase sólida serão evidenciados pelas reações subseqüentes, primeiro com o anticorpo IgG anti-humano (conjugado com peroxidase horseradish) e, em seguida, com uma solução cromógena (TMB) em tampão substrato. A leitura colorimétrica será realizada por um espectrofotômetro a 450 nm, 620nm e 405 nm. A razão entre as densidades óticas dos dois poços é

então calculada e expressa em percentual de Avidéz.

### 3. REAGENTES FORNECIDOS COM O KIT: PREPARO E ESTABILIDADE

- Os reagentes são suficientes para 96 poços, o que corresponde a 45 testes.
- Armazenar o kit entre 2 e 8°C.
- A data de validade de cada reagente é apresentada no rótulo do frasco.
- Uma vez aberto, o kit é estável quando armazenado entre 2 e 8°C por 2 meses.

#### 3.1 Reagentes Específicos

- **Microplaca Sensibilizada:** 96 poços quebráveis, revestidos com antígeno de Rubéola purificado e inativado. Manter os poços não utilizados entre 2 e 8°C na bolsa plástica fornecida (recipientes de microplaca) e cuidadosamente vedada.

- **Controle de Baixa Avidéz:** 1 frasco de soro padrão com anti-Rubéola IgG humano de baixa avidéz. Liofilizado e de coloração vermelha. Conservante: NaN3 (<0.1%). Antes do uso, reconstituir o conteúdo do frasco com 2ml de água destilada. Após a reconstituição, armazenar entre 2 e 8°C por 2 meses; para períodos mais longos congelar a -20°C.

- **Controle de Alta Avidéz:** 1 frasco de soro padrão com anti-Rubéola IgG humano de alta avidéz. Liofilizado e de coloração azul. Conservante: NaN3 (<0.1%). Antes do uso, reconstituir o conteúdo do frasco com 2 ml de água destilada. Após a reconstituição, armazenar entre 2 e 8°C por 2 meses; para períodos mais longos congelar a -20°C.

- **Reagente de Dissociação:** 1 frasco (10ml) de Uréia em solução tampão. Pronto para o uso.

- **Conjugado Enzimático:** 1 frasco (14ml) de conjugado mono clonal de camundongo IgG anti-humano com peroxidase horseradish (HRPO) em soro padrão com estabilizantes. Pronto para o uso e de coloração rosa. Conservante: Neomicina.

#### 3.2 Reagentes comuns para os kits To.R.C.H. S.T.D. e Linhas de Doenças Infantis

- **Solução de Lavagem (concentrada):** 1 frasco (50ml) de PBS-Tween 20. Conservante: Timerosal (<0.05%). Antes do uso, diluir a quantidade necessária na proporção de 1:20 com H<sub>2</sub>O destilada. Armazenar a Solução de Lavagem diluída por 30 dias entre 2 e 8°C. No caso de cristais não dissolvidos, ressuspender a solução colocando o frasco a 37°C por alguns minutos.

- **Diluyente de Amostra (concentrado):** 1 frasco (20ml) de soro padrão com estabilizantes, de coloração vermelha. Conservante: NaN3 (< 0.1%). Antes do uso, diluir na proporção de 1:20 com Solução de Lavagem previamente diluída (ver item 2). Armazenar o Diluyente de Amostra diluído por 30 dias entre 2 e 8°C.

- **Cromógeno:** 2 frascos (15ml) de Tetrametilbenzidina com tampão citrato-fosfato, DMSO.H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pronto para uso.

- **Reagente de Bloqueio:** 1 frasco (14ml) de 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pronto para uso.

- **Seladores de Placas Adesivos**

- **Bolsa plástica**

## **4. MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NAO FORNECIDO.**

### **4.1 Teste Manual**

- Pipetas ajustáveis e automáticas que utilizem ponteiros descartáveis.
- Estufa seca, ajustável à temperatura de  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- Provetas graduadas para diluição de reagente.
- Bomba de aspiração ou lavadora automática para lavagem dos poços.
- Espectrofotômetro de microplaca capaz de medir absorbâncias no intervalo de 0-3. A e filtros de 450nm, 620nm e 405 nm.
- H<sub>2</sub>O destilada.

### **4.2 Teste Automático**

- Este teste pode ser realizado em equipamento automatizado para microplacas em kits ELISA.
- Garantimos sua aplicação em equipamentos automatizados RADIM e/ou SEAC.
- Caso o usuário utilize um equipamento não-RADIM ou SEAC para microplaca fica sob sua responsabilidade assegurar-se que o equipamento foi apropriadamente testado para os kits ELISA.

## **5. AVISOS E PRECAUÇÕES**

**Para que sejam obtidos resultados reprodutíveis e corretos, as seguintes regras deverão ser observadas:**

- Não misturar reagentes específicos (ver 3.1) de lotes diferentes.
- É possível misturar reagentes comuns (ver 3.2) de lotes diferentes.
- Não utilizar reagentes depois de expiradas as suas datas de validade.
- Não armazenar ou deixar reagente e amostras em temperaturas elevadas ou em áreas de possível contaminação.
- Utilizar vidros completamente limpos, sem contaminação de íon metálico ou substâncias oxidantes.
- Utilizar água destilada ou deionizada, armazenadas em recipientes perfeitamente limpos.
- Evitar cuidadosamente qualquer contaminação entre amostras: para esta finalidade ponteiros descartáveis • devem ser utilizadas para cada amostra e reagente.
- Não modificar de forma alguma o Procedimento do Ensaio. Se não for respeitado:
  - o tempo exato de incubação, a quantidade a ser adicionada nos reagentes e a temperatura; poderão acarretar resultados clínicos incorretos.
  - Reconstituir os reagentes liofilizados, se presentes, conforme descrito nos respectivos rótulos. Qualquer desvio no uso do reagente ou volumes errados pode afetar a confiabilidade do resultado obtido.
  - No caso de procedimento manual, é importante utilizar pipetas calibradas e possuir os manuais técnicos apropriados. É de fundamental importância uma preparação e distribuição precisa dos reagentes. Assegurar que todo equipamento utilizado se encontra em perfeitas condições de uso, tenha sido corretamente

calibrado e cumpriu todas as manutenções regularmente.

- Assegurar que a bomba de aspiração ou lavadora automática para lavagem dos poços se encontra em perfeitas condições de uso. A rinsagem inadequada dos poços pode causar classificações errôneas das amostras. Assegurar que todo equipamento utilizado se encontra em perfeitas condições de uso.

- Assegurar que o espectrofotômetro de microplacas se encontra em perfeitas condições de uso. O uso de um espectrofotômetro não calibrado ou filtros sujos podem causar uma leitura errônea das amostras com conseqüentes classificações incorretas das amostras. Assegurar que todo equipamento utilizado se encontra em perfeitas condições de uso.

- Assegurar que a estufa seca (se necessário) se encontra em perfeitas condições de uso. A temperatura de incubação diferente de  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$  pode causar uma perda da sensibilidade e/ou desnaturação biológica (amostras e/ou reagentes). Assegurar que o equipamento utilizado se encontra em perfeitas condições de uso e, periodicamente verificar a temperatura registrada.

- Assegurar que o agitador de microplaca (se necessário) se encontra em perfeitas condições de uso. Uma má agitação pode causar classificações incorretas das amostras. Assegurar que o equipamento utilizado se encontra em perfeitas condições de uso.

- Assegurar que todo equipamento utilizado para armazenagem das amostras e/ou o sistema se encontram em perfeitas condições de uso. A armazenagem em temperatura diferente da sugerida pode causar desnaturação do material biológico (amostras e/ou reagentes). Assegurar que todo equipamento utilizado se encontra em perfeitas condições de uso e, periodicamente verificar a temperatura registrada.

- Utilizar um método apropriado para correta identificação das amostras de pacientes. A identificação errônea pode causar perda da especificidade do sistema e resultados clínicos incorretos.

**Para evitar contaminação ambiental e pessoal, as seguintes precauções devem ser observadas:**

- Ao manipular material potencialmente infectante e durante a realização do ensaio, utilizar luvas descartáveis.

- Não pipetar reagentes com a boca.

- Não fumar, comer, beber ou aplicar cosméticos durante o ensaio.

- Os reagentes: Cromógeno e Bloqueador devem ser manipulados com cuidado. Evitar o contato com a pele, olhos e mucosas. No caso de acidente, enxaguar com água corrente em abundância.

- Todo material de origem humana utilizado para preparação deste kit foi testado e considerado negativo para HBsAg, anti-HIV e anti-HCV. Considerando que nenhum teste no momento pode garantir ausência completa destes vírus, todas as amostras e reagentes contendo material biológico utilizado para o ensaio devem ser considerados potencialmente infectantes.

- Evitar respingos e formação de aerossol; nesses casos, lavar cuidadosamente com uma solução de 3% de hipoclorito de sódio. Todo o material de limpeza utilizado deve ser tratado como potencialmente infectante e descartado da forma

correta.

- Todo material utilizado no ensaio deve ser considerado como potencialmente infectante; portanto, deverá ser descontaminado antes de ser descartado e estar em conformidade com os procedimentos de segurança estabelecidos pela legislação local vigente.

- Alguns reagentes contêm azida sódica como conservante; para evitar a formação de azidas metálicas explosivas em tubulações de cobre e chumbo, os reagentes devem ser descartados lavando-se os canos de drenagem com grandes quantidades de água.

## 6. COLETA E PREPARO DA AMOSTRA

O ensaio pode ser executado em amostras de soro ou plasma. Amostras altamente lipêmicas ou hemolizadas devem ser descartadas. As amostras de plasma podem apresentar filamentos de fibrina que podem interferir no ensaio; assegurar previamente que as amostras estejam perfeitamente límpidas. Manter as amostras apropriadamente armazenadas entre 2 e 8°C durante 1 ou 2 dias; para períodos mais longos, é aconselhável congelar as amostras a -20°C. Evite múltiplos procedimentos de congelamento/descongelamento. Antes do uso, diluir as amostras na proporção de 1:300 com Diluente de Amostra (ver REAGENTES).

Exemplo: 10µl da amostra + 2990µl de Diluente de Amostra diluído.

## 7. PROCEDIMENTOS DO ENSAIO\*

- Para iniciar o ensaio, as amostras e reagentes deverão estar à temperatura ambiente.

- Homogeneizar as amostras por inversão antes do uso.

**7.1** Preparar os poços em duplicata para: Branco, Controle de Baixa Avidéz, Controle de Alta Avidéz e Amostras.

**7.2** Pipetar **100µl** do Controle de Baixa Avidéz nos poços C1 e D1; **100µl** do Controle de Alta Avidéz nos poços E1 e F1; **100µl** da primeira amostra (diluída) nos poços G1 e H1; proceder da mesma forma para todas as outras amostras.

**7.3** Cobrir a microplaca com a folha adesiva fornecida e incubar os poços durante **60 ± 5 minutos a 37 ± 2°C**.

**7.4** Aspirar à mistura incubada e lavar os poços **4 vezes** com **350µl** de Solução de Lavagem diluída. Aspirar todo líquido dos poços.

**7.5** Pipetar **100µl** do Diluente de Amostra em todos os poços ímpares (A1, C1, E1, G1, etc.) e 100µl do Reagente de Dissociação em todos os poços pares (B1, D1, F1, H1, etc.).

**7.6** Cobrir a microplaca com a folha adesiva fornecida e incubar os poços durante **30 ± 2 minutos a 37 ± 2°C**.

**7.7** Aspirar e lavar os poços conforme descrito no item 7.4.

**7.8** Adicionar **100µl** do Conjugado Enzimático em todos os poços.

**7.9** Cobrir a microplaca com a folha adesiva fornecida e incubar os poços durante **30 ± 2 minutos a 37 ± 2°C**.

**7.10** Aspirar e lavar os poços conforme descrito no item 7.4.

**7.11** Pipetar **100µl** de Cromógeno (TMB) em todos os poços.

**7.12** Incubar os poços durante **10 minutos a 37±2°C**.

**7.13** Pipetar **100µl** de Reagente Bloqueador em todos os poços.

**7.14** Ler a absorbância dos poços com um espectrofotômetro bicromático a **450nm**, com filtro de referência de **620nm** (ajustando o equipamento em zero com o poço Branco). No caso de excesso de valores de absorbância, ler a **405nm**. A leitura deve ser realizada em até 15 minutos após o final do ensaio.

\* Caso utilize um equipamento automatizado RADIM e/ou SEAC no procedimento, favor consultar o respectivo manual.

## 8. ESQUEMA DO ENSAIO:

Poços	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
Controle Baixa Avidéz	/	/	100µl	100µ	/	/	/	/
Controle Alta Avidéz	/	/	/	/	100µl	100µl	/	/
Amostra	/	/	/	/	/	/	100µl	100µl
Incubar a 37±2°C por 60 minutos ±5 Lavar 4 X com 350µl de Solução de lavagem								
Dilúente amostra	100µl	/	100µl	/	100µl	/	100µl	/
Reagente Dissociante	/	100µl	/	100µl	/	100µl	/	100µl
Incubar a 37±2°C por 30 minutos ±5 Lavar 4 X com 350µl de Solução de lavagem								
Conjugado	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubar a 37±2°C por 30 minutos ±5 Lavar 4 X com 350µl de Solução de lavagem								
Cromógeno	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubar a 37±2°C por 10 minutos								
Bloqueador	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Ler a 450 - 620nm / 405 - 620nm								

## 9. CÁLCULO DOS RESULTADOS

**9.a** Subtrair o valor do Branco (D.O. média dos poços A1 e B1) de todos os poços.

**9.b** Para cada amostra, assegurar que a D.O. dos poços incubadas com dilúente de amostra seja de >0.300. Se for, você pode prosseguir. Se não for, a amostra não tem concentração suficiente para avaliar a avidéz IgG (pacientes negativos à infecção Toxoplasma ou outros pacientes infectados com uma resposta do anti-corpo ainda muito fraca).

**9.c** Para cada amostra e controle, calcular a razão percentual entre a D.O. da cavidade tratada com Reagente de Dissociação e a D.O. da cavidade tratada com o Diluente de Amostra. Esta razão será a Avidéz percentual da amostra/controle.

$$\frac{\text{D.O. Reagente de Dissociação}}{\text{D.O. Diluente de Amostra}} \times 100 = \% \text{ Avidéz}$$

**9.d** Amostras com D.O. >3.00 a 540nm em ambas os poços, devem ser lidas a 405nm. Em tais casos, o percentual de avidéz têm que ser calculado, baseado na leitura no ponto 9.c..

- Se for utilizado um equipamento automático para leitura de microplacas RADIM e/ou SEAC, a leitura espectrofotométrica será realizada automaticamente em três comprimentos de onda diferentes: 450, 620 e 405 nm, permitindo desta forma uma faixa de leitura mais ampla.

### 9.1 Exemplo de Cálculo

Amostra	D.O. Diluente de amostra	D.O. Reagente de Dissociação	% de Avidéz
Controle de Baixa Avidéz	0.953	0.086	9.0%
Controle de Alta Avidéz	1.470	1.256	85.4%
Amostra	0.610	0.105	17.2%

### 9.2 Critério de Validação

A D.O. a 450nm dos Controles de Baixa e Alta Avidéz nos poços tratados com Diluente de Amostra devem ser >0.400.

O percentual de Avidéz (calculado conforme tabela acima) deve ser <50% para o Controle de Baixa Avidéz e >60% para o Controle de Alta Avidéz. Em qualquer caso, os resultados têm que ser estabelecidos pela avaliação clínica e teste de diagnóstico adicional.

### 9.3 Interpretação dos resultados

% de avidéz >60%	IgG anti-Rubeola com alta avidéz
% de avidéz 50-60%	IgG anti-Rubeola com avidéz média (zona cinza)
% de avidéz <50%	IgG anti-Rubeola com avidéz baixa

**\*Nota: Verificar sempre a validação do ensaio, baseando-se nos valores**

obtidos na Folha de Controle de Qualidade.

## 10. DESEMPENHO DO ENSAIO

### 10.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada em um grupo de 100 amostras clínicas com infecção passada ou secundária. O resultado foi de 100%.

### 10.2 Sensibilidade

A sensibilidade do método foi avaliada em um grupo de 56 amostras com infecção primária. O resultado foi de 87.8%.

### 10.3 Especificidade Analítica

A especificidade analítica pode ser definida como a habilidade do ensaio em detectar precisamente o analito específico na presença de fatores potencialmente interferentes na amostra padrão. Estudos controlados de substâncias potencialmente interferentes mostraram que a performance do ensaio não foi afetada por anticoagulantes (EDTA, citrato e heparina).

### 10.4 Precisão

A precisão foi avaliada em um equipamento da Radim determinando a repetibilidade e a reprodutibilidade do ensaio (variabilidade intra-ensaio e inter-ensaio), em 3 soros com diferentes porcentagens de avidéz.

#### Repetibilidade (intra-ensaio)

Soro	Media	±	D.S.	C.V.	Repetições
	(% de Avidéz)			%	Nº
A	96	±	2.0	2.5	10
B	72	±	4.0	5.2	10
C	17.1	±	1.3	7.5	10

#### Reprodutibilidade (inter-ensaio)

Soro	Media	±	D.S.	C.V.	Repetições
	(% de Avidéz)			%	Nº
A	95.5	±	4.7	4.8	10
B	74.9	±	9.94	13.36	10
C	17.53	±	2.17	12.36	10

## 11. LIMITES DE ENSAIO










Um resultado de Avidéz alta não exclui a possibilidade de uma infecção recente. Por outro lado, devido à alta especificidade do teste, um resultado positivo indica fortemente uma infecção nos 3 meses anteriores.

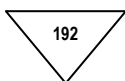
## BIBLIOGRAFIA

1. Miller E, Cradock-Watson JE, Pollock TM (1982). Consequences of confirmed maternal rubella at successive stages of pregnancy. *Lancet*: 781-784.
2. Eisen HN, Siskind GW (1964). Variations in affinity of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 7:996-1008.
3. Hedman K, Seppala I (1988). Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J. Clin. Immunol.* 8:214-221.
4. Rousseau S, Hedman K (1988). Rubella infection and reinfection distinguished by avidity of IgG. *Lancet* i: 1108-1109.
5. Thomas HIJ, Morgan-Capner P (1991). The use of antibody avidity measurements for the diagnosis of rubella.

## SÍMBOLOS

*EN 980 - EDMA*

REF	Referencia ou número do pedido
	Lote
	Data de vencimento
	Para uso diagnóstico In-vitro
	Marcação CE segundo a diretiva IVD 98/79 CE
	Conservar entre 2 e 8°C
	Fabricante
	Risco biológico
	Consultar as instruções de uso
	Suficiente para 96 testes



Suficiente para 192 testes

**RDATE**

Data de referência

**RCNS**

Reconstituir com

**H<sub>2</sub>O**

Água destilada ou deionizada

**Fabricado por:**

RADIM SPA  
Via del Mare, 125  
00040 – Pomezia  
ITÁLIA

**Importado e distribuído por:**

RADIM LATINO AMÉRICA DIAGNÓSTICOS LTDA.  
Rua Domingos de Moraes, 1061 cj 111 e 112 – Vila Mariana  
CEP. 04009-002 – São Paulo – SP  
CNPJ. 04.595.434/0001-32

**Serviço de Atendimento ao Consumidor:**

Fone: 11 – 5084-9669 / Fax: 11 – 5082-2029

**POTENCIALMENTE INFECTANTE**

Uso exclusivo para diagnóstico in vitro

Conservar entre 2<sup>o</sup> a 8<sup>o</sup>C

Reg: ANVISA: 80103990039

Resp.: Técnico: Sueli S. Nakano / CRBM - 4501

Revisão: 01