

INSTRUÇÕES DE USO

SD DENGUE IgM CAPTURE ELISA

EXPLICAÇÃO DO TESTE

O vírus da dengue é transmitido pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, presentes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Existem 4 sorotipos diferentes (vírus da dengue 1, 2, 3 e 4). A dengue é considerada a doença viral mais importante transmitida por artrópodes, devido à alta taxa de mortalidade que causa. A infecção primária é associada a febres médias e altas, dor de cabeça e rash cutâneo. A resposta imune inclui o aparecimento de anticorpos IgM depois do quinto dia do início dos sintomas, persistindo por até 30 a 60 dias. A IgG aparece depois do décimo quarto dia e persiste por toda a vida. Infecções secundárias geralmente resultam em febre alta e muitos casos aparecem associados à hemorragia e falência circulatória. A infecção secundária demonstra aumento nas taxas de IgM depois de 1 ou 2 dias do início dos sintomas, e induz a resposta IgM depois de 20 dias de infecção.

SD Dengue IgM Capture ELISA é um imunoensaio enzimático para detecção qualitativa de anticorpos IgM contra o vírus da dengue em soro humano. **SD Dengue IgM Capture ELISA** contém uma microplaca com poços pré-revestidos com anticorpos monoclonais de camundongo anti-IgM humano. Durante a primeira incubação, anticorpos IgM anti-dengue presentes na amostra do paciente se ligam aos anticorpos anti-IgM humanos presentes nos poços da microplaca, e então uma mistura de antígeno de dengue e anticorpos monoclonais do conjugado HRP são ligados também. Após esta incubação, todo material não ligado é removido através de aspiração e lavagem. A atividade enzimática residual será diretamente proporcional à quantidade de anticorpos IgM anti-dengue presente na amostra do paciente. Isso será evidenciado através da adição do substrato TMB. A leitura dos resultados se dará através do uso de um espectrofotômetro a 450nm.

SD Dengue IgM Capture ELISA destina-se a detecção qualitativa de anticorpos IgM contra dengue com alto grau de sensibilidade e especificidade. Este teste destina-se a uso profissional e deve ser utilizado como recurso adicional para o diagnóstico de dengue.

SD Dengue IgM Capture ELISA é um ensaio imunoenzimático para detecção qualitativa de anticorpos IgM contra Dengue em soro humano.

SD Dengue IgM Capture ELISA destina-se ao uso profissional e serve como auxílio no diagnóstico de infecção por vírus da dengue.

MATERIAIS FORNECIDOS

Componente	Descrição	96 testes
Microplaca revestida	96 poços (12x8) poços revestidos com anticorpos IgM anti-humanos. Estocar as tiras não utilizadas entre 2°C e 8°C na embalagem aluminizada com dessecante adequadamente selada.	1 placa
Antígeno de dengue	Pool de antígenos dengue 1, 2, 3 e 4. Estocar o frasco de antígeno não utilizado entre 2°C e 8°C.	2 frascos liofilizados 120µg
Diluyente de amostra	Tampão TRIS salina Conservante – Azida sódica (0,05%) Estocar o frasco de diluyente não utilizado entre 2°C e 8°C.	2 x 50 ml

Conjugado monoclonal de camundongo anti-dengue (2X concentrado)	Anticorpos anti-dengue conjugados com peroxidase de rábano (HRP) Conservante: Timerosal (0,1%) Estocar o frasco de conjugado não utilizado entre 2°C e 8°C.	1 x 10 ml
Diluyente do Conjugado	Tampão fosfato salina, albumina bovina sérica e estabilizantes. Conservante: Timerosal (0,1%) Estocar o frasco de diluyente do conjugado não utilizado entre 2°C e 8°C.	1 x 10 ml
Controle Positivo	Anticorpo IgM anti-dengue, soro humano positivo. Conservante: ProClin 300 (0,01%) Estocar o frasco de Controle Positivo não utilizado entre 2°C e 8°C.	1 x 0,2 ml
Controle Negativo	Soro humano normal. Conservante: ProClin 300 (0,01%) Estocar o frasco de Controle Negativo não utilizado entre 2°C e 8°C.	1 x 0,2 ml
TMB Substrato A	Acetato de sódio, peróxido de hidrogênio. Estocar o frasco de TMB Substrato A não utilizado entre 2°C e 8°C. OBS. Antes de usar preparar uma mistura 1:1 c/o TMB Substrato B.	1 x 10 ml
TMB Substrato B	Tetrametilbenzidina com tampão citrato-fosfato e ácido clorídrico. OBS. Antes de usar preparar uma mistura 1:1 com o TMB Substrato A.	1 x 10 ml
Solução de Lavagem (20X concentrada)	Tampão fosfato salina – Tween 20. Estocar o frasco de Solução de Lavagem não utilizada entre 2°C e 8°C.	1 x 50 ml
Solução de Parada	Ácido sulfúrico 1,6N. Pronto para uso. Estocar o frasco de Solução de Parada não utilizado entre 2°C e 8°C.	1 x 20 ml
Selo adesivo para microplaca		
Instruções de uso		

PRECAUÇÕES E CUIDADOS

Para obter resultados reproduzíveis, os cuidados descritos abaixo devem ser tomados:

- Utilizar apenas para diagnóstico *in vitro*.
- O teste deve ser feito apenas em amostras de soro. O uso em sangue total ou plasma não foi determinado.
- Todos os reagentes devem ser trazidos à temperatura ambiente (15°C a 30°C) antes de serem utilizados.
- Como os substratos TMB são susceptíveis à contaminação por íons metálicos, não deixar que os mesmos entrem em contato com superfícies metálicas.
- Evitar exposição prolongada à luz.

- Não misturar reagentes de diferentes lotes.
- Utilizar recipientes de vidro limpos, livre de contaminação por íons metálicos ou substâncias oxidantes para preparar e armazenar as soluções de trabalho.
- Utilizar luvas descartáveis enquanto manuseia materiais potencialmente infectantes, e durante a realização de todo o ensaio.
- Os substratos TMB A e B, assim como a solução de parada devem ser manuseados com cuidado. Evite contato com a pele, olhos e membranas mucosas. Em caso de acidente, lavar a região abundantemente com água.
- A azida sódica inibe a atividade do conjugado enzimático. Pipetas e ponteiros limpas devem ser utilizadas para a manipulação do conjugado enzimático.

COLETA, PREPARO E ARMAZENAGEM DAS AMOSTRAS

- Coletar o sangue total através de venipunção.
- Centrifugar o sangue total para obter soro.
- Se a amostra não for utilizada imediatamente, deve ser refrigerada entre 2°C a 8°C. Para períodos de armazenagem acima de 3 dias, o congelamento da amostra é recomendado. Antes da realização dos testes as amostras devem atingir temperatura ambiente (15°C – 30°C).
- Amostras contendo precipitados podem ocasionar resultados inconsistentes. Antes do uso, estas amostras devem ser clarificadas.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Pré-diluição do soro

- Preparar os poços a serem utilizados e os outros reagentes. Deixar que todos os reagentes alcancem a temperatura ambiente (15°C -30°C).
- Utilizando tubos de ensaio apropriados ou uma placa de microtitulação, diluir 3 controles negativos, 2 controles positivos e as amostras de pacientes 1/100 com o Diluyente de Amostras. Por exemplo, 10µl de Controle Positivo, Controle Negativo ou Amostra de paciente + 990µl do Diluyente de Amostras.
- Misturar bem.

Procedimento ELISA

a) Antígeno de dengue

- Diluir um frasco do Antígeno Dengue em pó usando 3 ml do Diluyente do Conjugado.
- Diluir o Conjugado Anti-Dengue HRP 1:1 com o Antígeno de Dengue diluído acima (1). Por exemplo, 3 ml do Conjugado Anti-Dengue HRP + 3 ml do Antígeno Dengue diluído. Isto é suficiente para 6 tiras (48 testes)
- Misturar delicadamente e deixar atingir a temperatura ambiente (15°C a 30°C) por 60 minutos. Descartar o material diluído não utilizado.

b) Ensaio da placa

- Dez minutos após misturar o conjugado anti-dengue HRP, pipetar 100 µl dos controles diluídos e amostras dos pacientes em seus respectivos poços da microplaca.
- Cobrir a microplaca com o adesivo selador. Incubar a 37°C (±1°C) por 60 minutos.
- Lavar os poços 5 vezes com 350 µl da solução de lavagem diluída, dando um espaço de tempo de 10 segundos de tempo para o contato em cada lavagem e aspirar todo o líquido dos poços (Antes do uso, usar o conteúdo de um frasco – 50 ml – da solução de lavagem e elevar a volume com 1000 ml de água destilada. Ou, lavar cada poço 5 vezes com Solução de Lavagem diluída utilizando uma lavadora automática.

3.1 Procedimento de lavagem

a. Lavadora automática

1. Aspirar completamente todos os poços.
2. Preencher todos os poços (350µl de Solução de Lavagem Diluída durante o ciclo de lavagem)
3. Ao completar 5 lavagens, inverter a placa e bater firmemente sobre papel absorvente para assegurar que toda a solução de lavagem tenha sido removida.

b. Lavagem manual

1. Descartar o conteúdo a microplaca em um recipiente para dejetos apropriado.
2. Preencher os poços com Solução de Lavagem Diluída. Evitar a formação de bolhas da Solução de Lavagem, pois isto pode reduzir a eficiência da lavagem. Descartar a Solução de Lavagem dos poços imediatamente.
3. Repetir a etapa 2 mais 4 vezes. Isto irá totalizar cinco lavagens com a Solução de Lavagem.
4. Após lavagem final, descarta o conteúdo dos poços e inverter a placa e bater firmemente sobre papel absorvente para assegurar que toda a solução de lavagem tenha sido removida.
- 4). Misturar a solução de conjugado diluído Anti-Dengue HRP antes de transferir. Pipetar 100 µl da solução de conjugado diluído Anti-Dengue HRP dentro do respectivo poço da microplaca.
- 5) Cobrir a microplaca com filme adesivo. Incubar os poços a 37°C ± 1°C durante 60 minutos.
- 6) Lavar os poços cinco vezes com 350 µl de Solução de Lavagem diluída, dando um espaço de tempo de 10 segundos de tempo para o contato em cada lavagem e aspirar todo o líquido dos poços (Antes do uso, usar o conteúdo de um frasco – 50 ml – da solução de lavagem e elevar a volume com 1000 ml de água destilada. Ou, lavar cada poço 5 vezes com Solução de Lavagem diluída utilizando uma lavadora automática (Consultar item 3.1).
- 7) Misturar o Substrato TMB A e o Substrato TMB B (1:1). Por exemplo, 5 ml de substrato TMB A + 5 ml de substrato TMB B. Esta quantidade é suficiente para 12 tiras (96 testes).
- Precaução:** quando a solução TMB for preparada, alguns cristais podem ser gerados. Neste caso, preparar a solução novamente, agitando delicadamente.
- 8) Pipetar 100 µl de solução TMB preparada em cada poço.
- 9) Incubar por 10 minutos em temperatura ambiente (15°C a 30°C). Uma coloração azul irá se desenvolver.
- 10) Pipetar 100 µl de solução de parada em cada poço, na mesma seqüência que a solução TMB foi pipetada. Misture delicadamente. A coloração azul se transformará em amarela.
- 11) No espaço de tempo de 30 minutos, realizar a leitura das absorbâncias de cada poço, através de um espectrofotômetro de 450nm com referência em 620nm.

Interpretação dos Resultados

1. Validação do teste

- Os valores individuais das absorbâncias dos soros controle serão utilizados para calcular o valor médio se:
- $0,000 \leq A (\text{neg}) \leq 0,300$
A (pos) $\geq 1,000$

Se um dos valores de absorbância dos controles negativos estiver fora das especificações, este valor deve ser negligenciado. Os dois valores de absorbância dos controles positivos devem estar dentro das especificações. Se estas especificações não forem atingidas, o teste deve ser repetido.

2. Avaliação

Calcular a média das absorbâncias do controle negativo, e então calcular o "cut-off" adicionando 0,300.

$$A (\text{negativo}) + 0,300 = \text{valor do "cut-off"}$$

Baseado no critério do teste, as amostras deverão ser classificadas da seguinte maneira:

Resultado do teste

i.	A (amostra) < "cut-off" → Anti-Dengue IgM Negativo
ii.	A (amostra) > "cut-off" → Anti-Dengue IgM Positivo

Amostras com resultado de teste igual ou maior que o valor de "cut-off", devem ser primeiramente retestados em duplicata. Se, neste reteste a absorbância média é novamente igual ou maior que o valor do "cut-off", estas amostras deverão ser submetidas a um teste confirmatório.

3. Interpretação dos resultados

- (1) Resultado negativo – Nenhum anticorpo anti-dengue IgM é detectável. O resultado não exclui uma infecção e dengue. Uma amostra adicional deve ser testada em 7-14 dias se houver suspeitas de infecção no estágio inicial.
- (2) Resultado positivo – Presença de anticorpos anti-dengue IgM. Outros testes sorológicos por dengue devem ser realizados para confirmar a infecção por dengue.

Limitações e Interferências

1. O procedimento do teste, precauções e interpretação dos resultados deve ser seguido à risca de acordo com o manual.
2. O teste deve ser feito em pacientes com sintomas clínicos ou quando a exposição for suspeitada.
3. Amostras
 - Amostras pasteurizadas (não menos que 10 horas a 60°C) podem ter sua reatividade diminuída, e, portanto, não devem ser utilizadas.
 - Amostras hemolisadas devem ser centrifugadas antes do uso para evitar interferências pelos constituintes celulares.
 - Amostras lipêmicas e ictericas podem influenciar no resultado do testes.
 - O fator reumatóide pode causar uma reatividade elevada se estiver contido nas amostras.
4. Podem ocorrer reatividade sorológica cruzada com os vírus do grupo flavivirus (encefalite Murray-Valley, entre os sorotipos 1 a 4 da dengue, encefalite japonesa, febre amarela e vírus West-Nile). Estas doenças devem ser excluídas antes da confirmação do diagnóstico.
5. Anticorpos heterofílicos podem causar interferências em imunoenaios. Estes anticorpos anti-IgG animal podem apresentar reações cruzadas com os anticorpos do reagente e causar resultados falso positivos.
6. A falha em adicionar amostras no procedimento pode resultar em resultados falsamente negativos. A repetição do teste deve ser considerada, quando houver uma suspeita clínica de infecção.

8. Armazenagem e estabilidade

1. Armazenar o kit entre 2°C e 8°C. O kit fechado é estável até a data de validade impressa na embalagem externa do kit e na rotulagem de cada componente do kit.
2. A estabilidade dos reagentes após a abertura é a seguinte:

Material/Reagente	Status	Estocagem	Estabilidade
Microplaca revestida	Após abertura	2°C – 8°C selada	1 mês
Antígeno dengue	Após abertura	2°C – 8°C	Data de validade

Conjugado anti-Dengue HRP (2X)	Após abertura	2°C – 8°C	3 meses
Conjugado (Sol.de Trabalho)	1:1 diluída	2°C – 8°C	30 minutos (*)
Diluinte de amostras	Após abertura	2°C – 8°C	3 meses
Controle Negativo	Após abertura	2°C – 8°C	3 meses
Controle Positivo	Após abertura	2°C – 8°C	3 meses
TMB Substrato A	Após abertura	2°C – 8°C em frasco fechado, protegido da luz	Até a data de validade
TMB Substrato B	Após abertura	2°C – 8°C em frasco fechado, protegido da luz	Até a data de validade
Solução de trabalho TMB A+TMB B	1:1 misturado	Temperatura ambiente em frasco fechado, protegido da luz	1 hora
Solução de Lavagem	Após abertura	2°C – 8°C	Até a data de validade
Solução de Lavagem de Trabalho	1:20 diluída	2°C – 8°C Temperatura ambiente	3 meses 4 semanas
Solução de parada	Após abertura	Temperatura ambiente	Até a data de validade

* No espaço de tempo de 30 minutos pipetar 100µl dentro da microplaca.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

[Estudo de avaliação clínica]

O **SD Dengue IgM Capture ELISA** foi testado com amostras clínicas positivas e negativas que foram comparadas com o teste HAI (Inibição por Hemaglutinação) em um estudo clínico multicêntrico.

1. Resultado do SD Dengue IgM Capture ELISA

Características de Desempenho			Resultados do SD Dengue IgM Capture ELISA		Resultados
Especificação	Tipo	Número	Positivo	Negativo	
Dengue IgM Positivo (HAI)	DEN-1	52	50	2	Sensibilidade 96,4% (133/138)
	DEN-2	42	40	2	
	DEN-3	27	27	0	
	DEN-4	17	16	1	
	Total	138	133	5	
Dengue IgM negativo	Dengue IgG positivo (HAI)	30	0	30	Especificidade 98,9% (266/269)
	Dengue IgG/IgM negativo	239	3	236	
	Total	269	3	266	

2. Resultado do tipo de Vírus da Dengue

	Resultados de número de amostras positivas totais (Sensibilidade %)				
	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	Total
SD	50/52 (96,2%)	40/42 (92,5%)	27/27 (100%)	16/17 (94,1%)	133/138 (96,4%)

3. Resultados de Sensibilidade do SD Dengue IgM Capture ELISA com amostras coletadas no momento da alta hospitalar

Teste referência	Índice do teste	Momento da coleta da amostra ou grupo	Status da infecção de Dengue	Vp	Fp	Fn	Vn
Teste HI	SD	Precoce aguda	Primária	9		1	
		Precoce aguda	Secundária	124		4	

Vp – verdadeiramente positivo
Fp – falsamente positivo
Fn – falsamente negativo
Vn – verdadeiramente negativo

Teste Dengue por ELISA	N° de amostras de soro positivas/N° total de amostras testadas (% sensibilidade)					
	Dengue primária (5)			Dengue secundária (%)		
SD Dengue IgM Capture ELISA	10	9/10	90,0%	128	124/128	96,9%

[Estudo e reatividade cruzada]

- Os pesquisadores da SD realizaram pesquisas em amostras onde **SD Dengue IgM Capture ELISA** pode ocorrer uma reatividade cruzada. Estas amostras foram fornecidas pelo Depto. da Divisão de Doenças Virais do hospital da Universidade da Coréia.
- Resultados dos testes
O **SD Dengue IgM Capture ELISA** foi testado em 84 amostras clínicas potencialmente capazes de apresentar reações cruzadas apresentaram resultado negativo. Conseqüentemente, **SD Dengue IgM Capture ELISA** não apresenta reações com amostras potencialmente capazes de apresentar reação cruzada, tais como Dengue IgG, encefalite japonesa, malária PV, Esfregaço de Thyphus, vírus Hantaan, Leptospira e malária P.f positivo.

1. Soro positivo Dengue IgG	Resultados		
	Positivo	Negativo	Especificidade
2. Soro positivo de encefalite japonesa	0	30	
3. Soro positivo malária P.f.	0	4	
4. Soro com Esfregaço de thypus	0	10	
5. Soro com vírus Hantaan	0	10	
6. Soro com Leptospira	0	10	
7. Soro positivo Malária P.V.	0	10	
Total		84	84/84 = 100%

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Enzyme-linked immunoassay for dengue virus IgM and IgM antibodies in serum and filter paper blood. Tran TN, de Vries PJ, Hoang LP, Phan GT, Le HQ, Tran BQ, Vo CM, Nguyen NV, Kager PA, Nagelkerke N, Groen J. BMC Infect Dis. 2006 Jan 25;6:13.
- Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM) /IgM optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. Falconar AK, de Plata E, Romero-Vivas CM. Clin Vaccine Immunol. 2006 Sep;13(9):1044-51.
- Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgM enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgM ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul;10(4):622-30.
- Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. De Paula SO, Fonseca BA. Braz J Infect Dis. 2004 Dec;8(6):390-8. Epub 2005 May 9. Review.
- Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of dengue virus infection. Sang CT, Hoon LS, Cuzzubbo A, Devine P. Clin Diagn Lab Immunol. 1998 May;5(3):407-9.
- Evaluation of a capture screening enzyme-linked immunosorbent assay for combined determination of immunoglobulin M and G antibodies produced during Dengue infection. Kit Lam S, Lan Ew C, Mitchell JL, Cuzzubbo AJ, Devine PL. Clin Diagn Lab Immunol. 2000 Sep;7(5):850-2.
- Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, Kalayanarooj S, Nguyen MD, Kneen R, Cuzzubbo A, Devine P. Am J Trop Med Hyg. 1999 Apr;60(4):693-8.

Produzido por:

STANDARD DIAGNOSTICS INC.
34, Pajang-dong, Jangnan-ku, Suwon-si
Kyonggi-do
Coréia
<http://www.standardia.com>

Importado e distribuído por:

RZ DE OLIVEIRA DIAGNÓSTICA - EPP
Rua Campevas, 627
CEP. 05049-030 - São Paulo - SP
CNPJ 05.328.040/0001-80

Para uso exclusivo diagnóstico "in vitro"

Reg. ANVISA 80313040036
Téc. Resp. Dra. Renata Zuculin de Oliveira - CRF-SP 37986
CONSERVAR ENTRE +2°C a 8°C.
PARA DESCARTAR, CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO

SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE:

Quaisquer dúvidas técnicas no manuseio deste kit ou no seu procedimento, contatar a nossa **ASSESSORIA CIENTÍFICA.**
Atendimento ao consumidor - Fone (011) -3871-0095

Revisão Julho/2008.

Dra. Renata Zuculin de Oliveira
Responsável Legal e Técnico