

DIACHECK Anti-EBV IgG

Dr. Julio Moran, Laboratorien, Lohwisstrasse 32, CH-8123 Ebmatingen, Switzerland www.jmlab.ch

Imunoensaio indireto para a detecção de anticorpos IgG contra os agentes infecciosos do vírus Epstein Barr. Somente para uso diagnóstico *in vitro*

1) Intenção de uso

Imunoensaio indireto para detecção de anticorpos IgG contra o vírus Epstein Baar em soro ou plasma humanos. O ensaio imunoenzimático é destinado ao teste de amostras individuais, não em pool. Kit para diagnóstico *in vitro*, para ser utilizado por pessoas tecnicamente qualificadas. O teste pode ser feito manual ou em equipamentos totalmente automatizados. A identificação da amostra do paciente através do uso de código de barras confere identificação correta dos pacientes e é recomendado.

2) Relevância do diagnóstico

A grande maioria das infecções primárias por EBV se dão pela saliva, ocorrem na infância e geralmente são sub-clínicas. O agente infeccioso Epstein Baar é um vírus da família *Herpesviridae*. A detecção de anticorpos contra EBV contribui significativamente para o diagnóstico sorológico destas infecções. A detecção de anticorpos específicos IgG, IgM e IgA contra EBV tem se mostrado importante ferramenta de acompanhamento de pacientes com infecções associadas ao vírus Epstein Baar após infecção primária por ele.

3) Princípio do método

Anticorpos IgG contra EBV se presentes na amostra do paciente são imobilizados pelos antígenos que sensibilizam os poços da microplaca. Os anticorpos humanos ligados nos poços da microplaca são detectados por anticorpos específicos conjugados à HRP e depois revelados pelo substrato cromogênico através de uma reação de cor. Depois que a reação de cor se acaba, a cor inicialmente azul se torna amarela e a intensidade da cor amarela é medida pelo uso de espectrofotômetro. A intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra.

4) Conteúdo do kit (96 testes)

Descrição	Quantidade	Apresentação
Instruções de uso	1	-
Adesivo selador	2	-
Pacote com etiquetas identificadoras adicionais	1	-
Microplaca sensibilizada	1	12X8 poços quebráveis
Controle negativo Nº 2 Pronto para uso	1	Frasco com 1,5 ml Solução verde
Controle diferencial Nº 3 Pronto para uso	1	Frasco com 3 ml Solução laranja

Controle positivo Nº 4 Pronto para uso	1	Frasco com 1,5 ml Solução vermelha
Diluyente de amostra Nº 5	2	Frasco com 20 ml
Aditivo para diluyente de amostra Nº 6	2	Frasco com 2 ml
Conjugado anti-IgG humano Nº 7 Pronto para uso	1	Frasco com 12 ml
Substrato TMB Nº 8/9 Pronto para uso	1	Frasco com 12 ml
Solução de lavagem concentrada 25 vezes Nº 10	1	Frasco com 20 ml
Solução de parada (ácido sulfúrico 0,2M – corrosivo) Nº 11 Pronto para uso	1	Frasco com 15 ml

5) Material necessário não fornecido

- Água deionizada
- Cilindros graduados 1000 ml, 500 ml, 250 ml, 100 ml para preparo das soluções.
- Pipetas de volume fixo ou variável com um volumes 10, 100, 200 e 1000 μ l
- Frascos adicionais (10 ml, 20 ml) para armazenar as soluções preparadas.
- Tubos com baixa absorção proteína (por exemplo, polipropileno, polietileno ou vidro) para armazenagem de soluções preparadas.
- Incubadora 37 ° C + / - 1 ° C (incubadora seca)
- Cronômetro.
- Lavadora: manual ou automática.
- Leitora de microplacas com filtro 450 nm para leitura e um filtro para 620 a 650 nm para referência (recomendável).

6) Armazenagem e estabilidade

Descrição	Armazenagem	Estabilidade	Observações
Componentes do kit fechado	2 a 8 ° C	até a data de validade	
Microplacas em utilização	2 a 8 ° C	6 semanas	Manter a embalagem bem fechada evitando umidade
Reagentes No. 2, 3, 4, 5, 6, 7 em utilização	2 a 8 ° C	12 semanas	Evitar temperaturas altas e contaminação
Diluyente de Amostra (nº5+nº6) pronto para uso	2 a 8 ° C	12 semanas	Preparar apenas o volume necessário e evitar a contaminação
Solução Substrato /TMB-	2 a 8°C	12 semanas	Evitar exposição direta à luz.

Cromógeno (nº8/9)			
Solução de lavagem pronta para uso	2 a 8° C 20 a 25 ° C	12 semanas máximo 2 semanas	Utilizar somente se a solução estiver clara.
Solução de Parada	2 a 8° C	Até a data de validade	

7) Coleta e manuseio das amostras

O plasma ou soro devem ser coletados por venipunção e devem ser testados em até 2 dias se armazenados entre 2 a 8 graus C. Para períodos de armazenagem superior, a amostra deve ser congelada em -20 graus C. Evitar repetidos ciclos de congelamento/descongelamento. Amostras contendo materiais particulados devem ser centrifugadas antes do uso, a fim de evitar resultados errôneos. Manusear as amostras como material potencialmente infectante.

8) Preparo dos reagentes e amostras.

É necessário que todos os reagentes alcancem temperatura ambiente antes da realização dos testes (20 a 25 graus Celsius).

Se os reagentes forem mantidos gelados na realização dos testes, ocorrerá um desenvolvimento de cor fraca no final dos testes, por outro lado, caso o ambiente esteja quente (30 graus C), a cor que irá se desenvolver será forte. Nestes casos, os critérios de validação devem ser corrigidos, através da correção do tempo de incubação.

- **Diluyente de amostras:** 2 ml de aditivo deve ser adicionado a um tubo, contendo 20 ml de diluyente de tampão. Trazer a temperatura ambiente somente o volume da solução a ser utilizado.

- **Solução de lavagem:** diluir a solução de lavagem concentrada 1:25 em água deionizada (20 ml de solução de lavagem: 480 ml de água deionizada). Utilize apenas soluções livres de material particulado.

- **Microplaca:** retire da embalagem apenas os poços que forem ser utilizados e deixe que eles atinjam temperatura ambiente.

- **Amostras:** as amostras devem ser testadas depois de diluídas 1:21. As amostras padronizadas para estas condições são soro ou plasma, porém, o uso de outras amostras é possível desde que os ajustes necessários sejam feitos.

9) Procedimento do teste

Antes de iniciar os testes, certifique-se de que os reagentes estejam em temperatura ambiente.

Prepare os poços a serem utilizados: um para controle negativo, dois para controle diferencial e um para controle positivo.

9.1) Pipetar 0,100 ml dos controle e das amostras diluídas (1:21 com diluyente de amostra). Pode-se também realizar a diluição das amostras diretamente no pocinho adicionando 0,200 ml de

diluinte de amostra (com aditivo) e depois 0,010 ml de amostra diretamente nos poços. Misture gentilmente e sele os poços com o adesivo selador.

9.2) Incube os poços a 37 graus C por 30 minutos.

9.3) Lave os poços por 4 vezes com 0,300 ml de solução de lavagem previamente preparada.

9.4) Adicione 0,100 ml de conjugado em cada poço. Cubra a placa com adesivo selador.

9.5) Incube os poços a 37 graus C por 30 minutos.

9.6) Lave os poços 4 vezes com 0,300 ml de solução de lavagem previamente preparada.

9.7) Adicione 0,100 ml de substrato TMB em cada poço.

9.8) Incube os poços por 15 a 20 minutos em temperatura ambiente (20 a 25 graus C), ao abrigo da luz.

9.9) Adicione 0,100 ml de solução de parada em cada poço.

9.10) Realize a leitura dos resultados com espectrofotômetro a 450nm com referência em 630nm.

10) Validação do teste

Os valores de ABS dos controles diferenciais serão aceitos se estiverem entre 0,080 e 1,00 (valor ideal: entre 0,200 e 0,600), e se o desvio dos controles diferenciais estiver em torno de 20%.

O valor index do controle negativo poderá ser aceito se for menor que 0,6 e o valor index de controle positivo se for maior que 1,4.

$$\text{Index} = \frac{\text{ABS do controle (+, - ou diferencial)}}{\text{Média ABS controle diferencial}}$$

Exemplo de uma validação

ABS controle negativo = 0,100
ABS controle diferencial 1 = 0,280
ABS controle diferencial 2 = 0,320
ABS controle positivo = 0,600
Média ABS controle diferencial = 0,300

Index

Controle negativo = $0,100/0,300 = 0,333$
Controle diferencial 1 = $0,280/0,300 = 0,933$
Controle diferencial 2 = $0,320/0,300 = 1,067$
Controle positivo = $0,600/0,300 = 2,00$

11) Cálculo dos resultados

Calcule os resultados da seguinte maneira:

$$\text{Resultado (Index)} = \frac{\text{ABS amostra/média}}{\text{ABS controles diferenciais}}$$

12) Avaliação dos resultados

Resultado menor que 0,90: negativo
Resultado entre 0,90 e 1,0: zona cinza
Resultado entre 1,0 e 1,5: fracamente positivo
Resultado entre 1,5 e 2,0: positivo
Resultado entre 2,0 e 3,0: altamente positivo

Resultado entre 3,0 e 5,0: título de anticorpos muito alto.

13) Medidas corretivas

13.1) Em casos de altos valores de ABS (por exemplo, 1,6 para controle diferencial), é possível aplicar fator de correção 0,5 para todos os valores e então prosseguir com a re-validação do teste. A re-validação pode ser feita se os critérios para os valores de controles positivo (maior que 1,4) e negativo (menor que 0,6) forem seguidos.

13.2) Em caso de amostras com valores de ABS maiores que 3,0, é possível a diluição da amostra seguido por redução dos volumes de amostra e controle. A re-validação pode ser feita se os critérios para os valores de controles positivo (maior que 1,4) e negativo (menor que 0,6) forem seguidos.

Caso essas eventuais medidas corretivas ainda não conduzirem a resultados aceitáveis o teste tem de ser repetido.

14) Interpretação dos resultados

Em geral a presença de anticorpos IgG contra EBV indica infecção passada ou vacinação. A detecção de anticorpos IgG no decurso de uma infecção pode indicar uma infecção atual, se os resultados de uma determinação paralela de dois exemplares de um mesmo paciente, tomada 10 a 14 dias de intervalo, indicar soro conversão.

Resultados indeterminados e reações fracas deverão ser re-analisados em conjunto com uma amostra adicional com 10 a 14 dias de intervalo. Se não forem detectadas diferenças de reatividade, uma infecção não deverá ser atribuída. Por outro lado, se houver diferenças nas reatividades entre as duas amostras, uma infecção atual pode ser indicada.

Altos índices de IgG podem indicar fase aguda de infecção.

Testes para detecção de fatores reumatóides na amostra e pré-absorção com sorbent antes da realização do ensaio é recomendado.

Os resultados de testes sorológicos não devem ser critérios únicos para diagnóstico definitivo. Apenas um médico poderá avaliar os resultados dos testes e em conjunto com fatores clínicos, e então dar o diagnóstico final ao paciente.

15) Literatura recomendada

-Mackie PL, The Classification of viruses infecting the respiratory tract. Paediatr Respir Rev 2003;4:457-61.

-Babcock GJ, Decker LL, Volk M., Thorley-Lawson DA. EBV persistence in memory B cells in vivo. Immunity 1998;9:395-404.

-Yao QY, Rickinson AB, Epstein MA. A reexamination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. Int J Cancer 1985;35:35-42.

-Epstein, M.A., B.B. Achong, and Y.M. Barr. 1964. Virus particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. In: *Lancet* 1:702-703.

-Epstein, M.A., Y.M. Barr, and B.G. Achong. 1965. Studies with Burkitt's Lymphoma. In: *Wistar Inst. Sympos. Monogr.* 4:69-82.

-Edwards JM, Woodroof M. EB virus-specific IgA in serum of patients with infectious mononucleosis and of healthy people of different ages. *Journal of Clinical Pathology* 1979;32:1036-1040

-Sumava CV. Epstein-Barr virus and infectious mononucleosis: a review. *J Clin Immunoassay* 1989;12:168-74

-Mazeron MC value of anti-Epstein-Barr antibody detection in the diagnosis and management of undifferentiated carcinoma of the nasopharynx. *Bull Cancer Radiother* 1996; 83 (1):3-7.

-Shimakage M; Dezawa T; Chatani M. Proper use of serum antibody titers against Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma: IgA / virus capsid antigen for diagnosis and EBV-related nuclear antigen – 2 for follow-up *Acta Otolaryngol* 2000 Jan.; 120(1): 100-4.

-Dardari R; Khyatti M; et al. Antibodies to the Epstein-Barr virus transactivator protein as a valuable biomarker in young patients with nasopharyngeal carcinoma *Int J Cancer* 2000 Apr 1; 86(1): 71-5.

Produzido por: Dr. JULIO MORAN LABORATORIEN - SUÍÇA

Importado e distribuído por:

RZ DE OLIVEIRA DIAGNÓSTICA - EPP

Rua Campevas, 627

CEP.05016-010 - São Paulo - SP

CNPJ 05.328.040/0001-80

Para uso exclusivo diagnóstico "in vitro"

Reg. ANVISA 80313040026

Téc. Resp. Dra. Renata Zuculin de Oliveira - CRF-SP 37986

POTENCIALMENTE INFECTANTE

CONSERVAR ENTRE +2°C e 8°C.

PARA DESCARTE, 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

