

HAV IgM

**REF: KHA5EW
96 TESTES**

RADIM

HAV IgM EIA WELL

REF: KHA5EW
96 TESTES

REAGENTES DO KIT

REAGENTES	QUANTIDADE	ESTADO FÍSICO
Microplaca	96 Testes	Pronto para uso
Controle Negativo	1 X 2,0 ml	Pronto para uso
Controle Positivo	1 X 2,0 ml	Pronto para uso
Calibrador	2 frascos	Liofilizado
Solução de lavagem 20X	1 X 50 ml	Concentrado
Conjugado Enzimático 20X	1 X 0,8 ml	Pronto para uso
HAV Ag	1 X 16 ml	Pronto para uso
Diluyente de Amostra	2 X 50 ml	Pronto para uso
Cromógeno / Substrato	1 X 16 ml	Pronto para uso
Reagente Bloqueador	1X 16 ml	Pronto para uso

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO DE “CAPTURA” (ELISA) PARA DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS IgM CONTRA O VÍRUS DA HEPATITE A EM PLASMA OU SORO HUMANO

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

1. APLICAÇÃO CLÍNICA

O Centro de Controle de Doenças ou CDC em Atlanta, EUA define o vírus da Hepatite A conforme segue:

A Hepatite A continua a ser uma das doenças mais freqüente relatada que possui vacinas preventivas no mundo, apesar do licenciamento da vacina de Hepatite A em 1995. A vacinação largamente difundida em populações susceptíveis abaxaria substancialmente a incidência da enfermidade e potencialmente eliminaria a transmissão da infecção do vírus da Hepatite A (HAV).

O HAV (vírus da hepatite A), agente RNA 27-nm classificado como picomavírus, pode causar uma infecção tanto sintomática como assintomática em seres humanos após um período médio de incubação de 28 dias (faixa de 15-50 dias). A doença causada pela infecção HAV tipicamente apresenta o estabelecimento abrupto de sintomas que podem incluir febre, mal estar, anorexia, náusea, desconforto abdominal, urina escura e icterícia.

A probabilidade de se ter sintomas com a infecção HAV está relacionado à idade da pessoa. Em crianças abaixo de 6 anos de idade, 70% das infecções são assintomáticas; caso a doença ocorra, em geral não é acompanhada de icterícia. Entre crianças mais velhas e adultas, em geral é sintomática, ocorrendo icterícia em 70% dos casos. Normalmente, os sinais e sintomas perduram menos que 2 meses, apesar de 10% a 15% das pessoas sintomáticas apresentam uma doença prolongada ou recaídas de até 6 meses.

Nas pessoas infectadas, o HAV replica-se no fígado, é excretado na bile e eliminado pelas fezes. O pico de infectividade ocorre durante o período de 2 semanas antes do estabelecimento da icterícia ou elevação das enzimas hepáticas, quando a concentração do vírus nas fezes é mais elevada. A concentração das fezes diminui após o surgimento da icterícia. As crianças pequenas podem eliminar HAV nas fezes durante períodos maiores que os adultos, até vários meses após o estabelecimento da fase clínica da doença. A eliminação crônica do HAV em fezes não ocorre; no entanto, a eliminação pode ocorrer em pessoas que apresentam recaídas da patologia.

A viremia ocorre logo após a infecção e persiste através do período da elevação das enzimas no fígado.

A Hepatite A não pode ser diferenciada de outros tipos de hepatite viral com base apenas em características clínicas ou aspectos epidemiológicos. O teste sorológico para detectar anticorpos imunoglobulina M (IgM) contra o cápside protéico do HAV (IgM anti-HAV). Na maioria das pessoas, o IgM anti-HAV torna-se detectável entre 5 a 10 dias antes do surgimento dos sintomas e pode persistir por até 6 meses após a infecção. A imunoglobulina G (IgG) anti-HAV, que se apresenta precocemente no decorrer da infecção, permanece detectável e confere uma proteção durante toda a

vida da pessoa contra a doença. Existem testes diagnósticos comercialmente disponíveis para a detecção de IgM e anti HAV total (IgM e IgG) em soro.

O RNA do HAV pode ser detectado no sangue e nas fezes da maioria das pessoas durante a fase aguda da infecção usando métodos de amplificação do ácido nucléico; o sequenciamento do ácido nucléico tem sido utilizado para determinar a relação entre os isolados HAV.

A infecção pelo HAV é adquirida primariamente pela via oral-fecal tanto em contato pessoa-pessoa ou por ingestão de alimentos ou água contaminados.

Raramente a infecção HAV é transmitida por transfusão sanguínea ou produtos sanguíneos coletados de doadores durante a fase virêmica de sua infecção. Em primatas não humanos infectados experimentalmente, o HAV foi detectado na saliva durante o período de incubação; no entanto, não foi demonstrada a transmissão pela saliva.

Dependendo das condições, o HAV pode ser estável no meio ambiente durante meses. Para inativar o HAV é necessário o aquecimento dos alimentos em temperaturas acima de 85°C durante um minuto ou a desinfecção com solução diluída 1:100 de hipoclorito de sódio (água sanitária) em água de torneira.

Devido ao fato da maioria das crianças terem infecções assintomática ou não identificável, as mesmas desempenham um papel importante na transmissão do HAV e serve como fonte de infecção para os demais. Em um estudo apenas com adultos sem uma fonte identificada da infecção, 52% de suas famílias incluíam criança menor que 6 anos de idade e a presença de crianças jovens foi associada com transmissão HAV para família. Em estudos onde o teste sorológico de contato familiar de adultos sem fonte identificada de infecção ocorreu, 25% - 40% destes contatos com crianças abaixo de 6 anos de idade apresenta uma evidência sorológica de infecção aguda por HAV (IgM anti-HAV).

2. PRINCÍPIO DO TESTE

Este teste baseia-se no princípio de “captura do IgM” onde os anticorpos de classe IgM na amostra são primeiramente capturados pela fase sólida revestida pelos anticorpos anti hlgM.

Após a lavagem de todos os outros componentes de amostra e principalmente os anticorpos IgG, o IgM específico capturado na fase sólida é detectado pela adição de um preparado purificado de HAV inativado, marcado com um anticorpo conjugado com peroxidase (HRP).

Após a incubação, as microcavidades são lavadas para remover conjugados não ligados e então é adicionado o cromógeno / substrato.

Na presença da peroxidase, o substrato incolor é hidrolisado a um produto final colorido, cuja densidade óptica pode ser detectada e é inversamente proporcional a quantidade de anticorpos HAV presentes na amostra.

3. REAGENTES FORNECIDOS COM O KIT

Os reagentes são suficientes para 96 testes

Reagentes Específicos

Microplaca revestida – 96 microcavidades autoquebráveis, revestidas com anticorpo IgM anti-humano purificado por afinidade, selada em embalagem com dessecante.

Controle negativo – 1 frasco 2 ml. Pronto para uso. Contém proteínas de soro de cabra – 10mM de tampão Tris pH 6,0 +/- 0,1 – 0,1% de Tween 20 – 0,09% de azida sódica e 0,1% de Kathon GC como preservativos.

Controle positivo – 1 frasco 2 ml. Pronto para uso. Contém anti-HAV IgM, proteínas de soro de cabra – 10mM de tampão Tris pH 6,0 +/- 0,1 – Tween 20 – 0,09% de azida sódica 0,1% de Kathon Gc como preservativos.

Calibrador – 2 frascos. Liofilizados. A ser dissolvido com água grau EIA conforme indicado no rótulo. Contém anti-HAV IgM – 2% BSA (albumina bovina sérica) – 10mM de tampão Tris pH 6,0 +/- 0,1 – 0,09% de azida sódica e 0,1% de Kathon GC como preservativo.

Nota: o volume necessário para dissolver o conteúdo do frasco pode variar de lote para lote. Favor usar o volume correto indicado no rótulo.

Solução de Lavagem concentrada 20X- 1 frasco 50ml. Solução concentrada 20X a ser diluída antes do uso a 1000ml com água destilada. Uma vez diluída, a solução de lavagem contém 10mM de tampão fosfato pH 7,0 +/- 0,2 – 0,05% de Tween 20 e 0,05% de Kathon Gc como preservativo.

Conjugado enzimático 20X concentrado – 1 frasco 0,8 ml. Contém anticorpos específicos para HAV conjugados com peroxidase de rábano (HRPO) – 10mM de tampão Tris pH 6,8 +/- 0,1 – 2% de BSA (albumina bovina sérica) – 0,1% de Kathon Gc e 0,02% de sulfato de gentamicina como preservativos.

Antígeno HAV – 1 frasco 16ml solução pronto para uso. Contém HAV inativado e estabilizado na presença de 10mM de tampão Tris pH 6,8 +/- 0,1 – 2% de BSA (albumina bovina sérica) – 0,1% de Kathon Gc e 0,02% de sulfato de gentamicina como preservativos. O reagente é codificado com a coloração vermelha.

Diluinte de amostra – 2 frascos de 50ml. Tampão protéico para diluição das amostras. Contém proteínas de cabra - 10mM de tampão Tris pH 6,0 +/- 0,1 – 0,1% de Tween 20 – 0,09% de azida sódica e 0,1% de Kathon GC como preservativos. O reagente é codificado com a coloração azul.

Cromógeno / Substrato – 1 frasco 16ml. Contêm 50mM de solução tampão citrato fosfato pH 3,5–3,8 - tetrametilbenzidina (TMB) e 0,02% de peróxido de hidrogênio.

Nota – deve ser estocada ao abrigo da luz, pois é um reagente fotossensível.

Reagente Bloqueador H_2SO_4 – 1 frasco 16ml de ácido sulfúrico 0,3N.

Atenção: irritante (Xi R36 / 38; S2 / 26 / 30)

Adesivos para selagem das microplacas

Instruções de uso

4. MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NAO FORNECIDO:

Teste manual

- Micropipetas ajustáveis, micropipetas automáticas com ponteiros descartáveis.
- Água grau EIA (duplamente destilada ou deionizada, tratada com carvão ativo para remoção de reagentes oxidantes usadas como desinfetantes)
- Cronômetro (timer) com faixa de 60 minutos ou acima.
- Papel absorvente.
- Incubadora com termostato para microplaca ELISA calibrada (a seco ou tipo banho-maria) capaz de realizar uma agitação a 1300 rpm +/- 150, a +{37}C.
- Leitora de microcavidades para ELISA calibrada com filtros 450nm e, se possível, filtros de 620-630nm (“blinking”).
- Lavadora de microplacas para ELISA calibrado.
- Vórtex ou similar.

Teste Automático

- Este teste pode ser utilizado com um instrumento automático para kit de ELISA em microplaca.
- Garantimos sua aplicação nos instrumentos automáticos da RADIM e/ou SEAC.
- Ao utilizar um instrumento automático, que não seja de fabricação da RADIM e/ou SEAC para microplacas, a responsabilidade final é do usuário em se certificar que o mesmo tenha sido apropriadamente testado para os testes por ELISA.

5. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

1. O kit deve ser usado somente por pessoal devidamente treinado e com prática, sob a supervisão do responsável técnico do laboratório clínico.
2. Todo pessoal envolvido do desempenho do ensaio deve usar roupas protetoras de laboratório (aventais, máscaras), luvas descartáveis e óculos. Deve ser evitado o uso de qualquer dispositivo afiado (agulhas) ou de corte (lâminas). Todo o pessoal envolvido deve ser treinado em procedimentos de biosegurança, conforme recomendado pelo CDC – Center for Disease Control (Centro de Controle de

Doenças de Atlanta, EUA) e relatado na publicação do Instituto Nacional de Saúde: “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories”, ed. 1984 (Laboratórios Biomédicos e Microbiológicos de Biosegurança).

3. Todo pessoal envolvido no manuseio de amostras deve estar vacinado contra o HBV e HAV, as vacinas utilizadas devem ser seguras e eficazes.

4. Todo o ambiente laboratorial deve ser controlado de modo a evitar contaminações bacterianas e poeiras oriundas do ar; tomar cuidado ao abrir os frascos do kit e microplacas, e ao realizar o teste.

Proteger o cromógeno (TMB) da incidência da luz direta e evitar vibração superficial da bancada quando o teste estiver sendo realizado.

5. Após o recebimento, armazenar o kit entre 2°C a 8°C em refrigerador com temperatura controlada ou câmara fria.

6. Não intercambiar os componentes de lotes diferentes dos kits. Recomenda-se que os componentes entre dois kits do mesmo lote não sejam trocados.

7. Verifique se os reagentes estão límpidos e não contém partículas precipitadas visíveis ou agregados. Se contiverem, avise o superior do laboratório para iniciar os procedimentos necessários para a substituição do kit.

8. Evitar a contaminação cruzada entre soro/plasma usando ponteiras de pipeta descartáveis e trocando as mesmas após cada amostra.

9. Evitar a contaminação cruzada entre reagentes do kit usando ponteiras de pipeta descartáveis e trocando as mesmas após cada uso.

10. Não use o kit após a data de vencimento registrada na parte interna e externa dos rótulos dos frascos. Um estudo realizado com um kit aberto não demonstrou nenhuma perda importante de atividade após 6 reusos do e até 6 meses após a abertura do kit.

11. Tratar todas as amostras como potencialmente infectantes. Todas as amostras de soro humano devem ser manipuladas como recomendado pelas normas de biosegurança nível 2, pelo Center for Disease Control sediado em Atlanta, EUA e de acordo com o estabelecido nas publicações dos Institutos de Saúde: ““Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories”, ed. 1984 (Laboratórios Biomédicos e Microbiológicos de Biosegurança).

12. Recomenda-se o uso de vidraria plástica descartável na preparação dos reagentes líquidos ou na transferência para as estações de trabalho automatizado, de modo a evitar a contaminação cruzada.

13. Os dejetos produzidos durante o uso devem ser descartados de acordo com as diretrizes e leis nacionais referentes aos dejetos laboratoriais de substâncias químicas e biológicas. Em particular, líquidos gerados pelo procedimento de lavagem, resíduos de controle e amostras devem ser tratados como potencialmente infectantes e inativados. Antes do descarte, sugere-se como procedimento de inativação o tratamento com uma solução de hipoclorito de sódio a 10% (alvejante doméstico), durante 16-18 horas ou inativação por calor de autoclave a 121°C durante 20 minutos.

14. Respingos acidentais de amostras e de etapas do procedimento devem se adsorvidos com papel absorvente umedecido com alvejante caseiro e a seguir com água. As toalhas de papel são a seguir descartadas em recipientes específicos para descarte de materiais hospitalares e de laboratório.

15. O Reagente Bloqueador é irritante. Em caso de respingos, lave a superfície com água em abundância.

16. Outros materiais gerados durante o uso do kit (por exemplo, ponteiros de pipetas usadas para amostras, controles e microplacas usadas) devem ser manuseados como potencialmente infectantes e descartado de acordo com as diretrizes e leis nacionais referentes a descarte laboratoriais.

6. AMOSTRA: PREPARO E RECOMENDAÇÃO

1. O sangue é coletado assepticamente por venipunção e o soro ou plasma é preparado usando técnicas convencionais de preparação de amostras para análises clínicas laboratoriais. Não foi observada nenhuma influência em amostras coletadas com os anticoagulantes citrato, EDTA e heparina.

2. As amostras devem ser claramente identificadas com códigos ou nomes para evitar a interpretação errônea de resultados. Quando um kit é utilizado para o rastreamento de unidades de sangue em graus, é fortemente recomendável a identificação por um rótulo com códigos de barras e leitura eletrônica.

3. Amostras hemolizadas e visivelmente hiperlipêmicas (aspecto leitoso) devem ser descartadas, pois podem gerar resultados falsos. As amostras contendo resíduos de fibrina, partículas pesadas, filamentos microbianos e corpúsculos devem ser descartados, pois podem gerar uma elevação de resultados falsos.

4. O soro e plasma podem ser armazenados entre 2° a 8°C até cinco dias após a coleta. Para períodos de armazenagem mais longos, as amostras podem ser armazenadas por congelamento a -20°C durante vários meses. Qualquer amostra congelada não deve ser congelada/descongelada mais que uma vez, pois podem ser geradas partículas que afetarão os resultados dos testes.

5. Se for observada turbidez ou houver suspeitas da presença de micropartículas após o descongelamento, filtrar a amostra em filtro descartável de porosidade 0,2-0,8µm para clarificar a amostra a ser utilizada ou adotar o método alternativo de duas etapas.

7. PREPARAÇÃO DOS COMPONENTES E AVISOS

Um estudo realizado em kit aberto não indicou perda relevante do desempenho até 3 meses de sua abertura.

1. Microcavidades revestidas com antígeno

Deixar que a microplaca atinja a temperatura ambiente (aproximadamente por uma hora) antes da abertura da embalagem. Verifique se o dessecante não se tornou verde escuro, indicando uma falha no processo de fabricação.

Neste caso, ligue para o SAC – Serviço de Atendimento ao Consumidor.

As tiras que não forem utilizadas devem ser colocados de volta na embalagem aluminizada, com o dessecante fornecido, firmemente selado e armazenada entre 2°-8°C. Após a primeira abertura, as tiras não utilizadas permanecem estáveis até o indicador de umidade dentro da embalagem do dessecante passar de amarelo para verde.

2. Controle Negativo

Pronto para uso. Misture bem em vórtex antes do uso.

3. Controle Positivo

Pronto para uso. Misture em vórtex antes do uso. Manipular este componente como se fosse potencialmente infectante, mesmo se o HAV, eventualmente presente no controle tenha sido inativado por calor.

4. Calibrador

Adicionar o volume de água grau ELISA informado no rótulo liofilizado; deixar dissolver por completo e então misturar suavemente em vórtex. O calibrador dissolvido não é estável; armazenar congelado em alíquotas a -20°C.

5. Solução de lavagem concentrada

A solução concentrada 20X deve ser diluída com água grau ELISA até 1000ml em misturar delicadamente por inversão antes do uso. Como alguns cristais podem estar presentes dentro do frasco, assegurar-se de dissolver todo o conteúdo ao preparar a solução.

Durante a preparação evitar a formação de espuma, pois a presença de bolhas pode impactar na eficiência dos ciclos de lavagem.

Nota: Uma vez diluído, a solução de lavagem é estável por 1 semana entre 2^a - 8°C.

6. Conjugado enzimático 20X concentrado

Pronto para uso. Misturar bem em vórtex antes do uso.

Evite a contaminação microbiana do líquido com substâncias oxidantes ou poeiras. Caso este componente deva ser transferido, usar somente vidraria de plástico e se possível, recipientes estéreis descartáveis.

7. Antígeno HAV

Pronto para uso. Misturar bem em vórtex antes do uso.

Manipular este componente como sendo potencialmente infectante, mesmo que o HAV tenha sido quimicamente inativado.

6+7. Complexo Antígeno HAV/Anticorpo

Cerca de 5 -10 minutos antes do uso, diluir o conjugado enzimático concentrado 20X no volume apropriado de antígeno HAV, necessário para o teste. A seguir misturar cuidadosamente no vórtex.

Exemplo: para analisar duas tiras, diluir 100µl do conjugado enzimático concentrado 20X em 2ml de Antígeno HAV.

Obs: este imunocomplexo não é estável; descartar o volume excedente.

8. Diluente de amostra

Pronto para uso. Misture bem em vórtex antes do uso.

9. Cromógeno / Substrato

Pronto para uso. Misturar bem em vórtex antes do uso.

Evite a contaminação microbiana do líquido com substâncias oxidantes ou poeiras. Não expor a incidência da luz e superfícies metálicas.

Caso o componente tenha que ser transferido, use somente plástico e se possível, recipientes estéreis descartáveis.

10. Ácido Sulfúrico

Atenção: irritante (Xi R36/38;S2/26/30)

R36/38: irritante para os olhos e pele.

S2/26/30: em caso de contato com os olhos, lavar imediatamente com água em abundância e procurar ajudas médicas.

8. EQUIPAMENTOS E DISPOSITIVOS USADOS EM COMBINAÇÃO COM O KIT

1. As micropipetas devem ser calibradas para dispensar o volume correto necessário pelo ensaio e devem ser submetidos à descontaminação regular (70% de etanol, 10% de solução alvejante, desinfetantes hospitalares) e das partes que poderiam entrar acidentalmente em contato com a amostra ou componentes do kit. Devem ser também submetidos regularmente a manutenção para demonstrar uma precisão de 1% e uma exatidão de +/- 2%.

2. A incubadora ELISA deve estar regulada a +37°C (tolerância de +/- 0,5°C) e regularmente verificado para assegurar que a temperatura correta está sendo mantida. Tanto o incubador a seco como em banho Maria são adequados para incubações e o equipamento deve estar validado para a incubação dos testes ELISA.

3. A lavadora de ELISA é extremamente importante durante todo o desempenho do ensaio. A lavadora deve estar cuidadosamente validada e corretamente otimizada usando os controles do kit e painéis de referência, antes de usar o kit para testes laboratoriais de rotina. Geralmente ciclos de lavagem de 4-5 (aspiração + dispensação de 300µl/microcavidade de solução de lavagem = 1 ciclo) são suficientes para assegurar que o ensaio tenha o desempenho desejado. Sugere-se um intervalo de 20-30 segundos entre os ciclos. Para configurar corretamente os números, é recomendado fazer um ensaio com os controles do kit e caracterizar bem as amostras de referência, amostras negativas e amostras positivas e verificar se os valores estão relatados na seção “Controle de Qualidade Interna”. Deve ser realizada, de acordo com as instruções do fabricante, calibrações rotineiras de volumes dispensados e a manutenção (descontaminação e limpeza das agulhas) da lavadora.

4. Os tempos de incubação têm uma tolerância de +/- 5 %.

5. A leitora de microplaca ELISA deve estar equipada com um filtro de leitura de 450nm e ter um segundo filtro (620-630nm) para propósitos de “blinking”. Seu desempenho padrão deve ser (a) largura da banda <10nm, (b) faixa de absorbância entre 0 a >2.0; (c) linearidade >2.0 (d) repetibilidade >1%. O “blinking” é realizada na microcavidade identificada na seção “Procedimento do ensaio”. O sistema óptico da leitora deve ser calibrado regularmente para assegurar que a medida da densidade óptica seja correta. Deve ser submetido à manutenção regular de acordo com as instruções do fabricante.

6. Ao usar a estação de trabalho automatizada ELISA, todas as etapas críticas (dispensação, incubação, lavagem, leitura, agitação, manipulação dos dados) devem ser cuidadosamente configuradas, calibrados, controlados regularmente verificados de modo a estar dentro dos valores especificados na seção “Controle de Qualidade Interno”. O protocolo do ensaio deve ser instalado no sistema de operação da unidade e validado com a lavadora e a leitora. Além disso, a manipulação dos líquidos na estação (dispensação e lavagem) devem ser validadas e configuradas corretamente. Uma atenção especial deve ser dada para evitar “carry-over” pelas agulhas usadas na dispensação e lavagem das amostras. Isto deve ser estudado e controlado para minimizar a possibilidade de contaminação das microcavidades adjacentes com amostras fortemente positivas que causam resultado falso positivos. O uso de estações de trabalho automatizado ELISA é recomendado para rastreamento do sangue e quando o número de amostras a ser testado exceder a 20-30 min por percurso.

7. O Serviço de Atendimento ao Consumidor oferece suporte ao usuário na configuração e verificação dos equipamentos usados em combinação com o kit, para assegurar a completa conformidade com os requerimentos descritos.

9. CONTROLES DE PRÉ-ENSAIO E OPERAÇÕES

- 1.** Verificar a data de vencimento do kit, impressa no rótulo externo da caixa do kit. Não use se estiver vencido.
- 2.** Verificar se os componentes líquidos estão contaminados por agregados ou partículas visíveis a olho nu. Verificar se o Cromógeno/Substrato está incolor ou azul pálido, aspirando um pequeno volume em uma pipeta de plástico estéril. Certificar-se se não ocorreu quebra de frasco durante o transporte nenhum líquido tenha se extravasado dentro da caixa do kit. Verificar se a embalagem aluminizada contendo a microplaca não esteja rompida ou danificada.
- 3.** Diluir todo o conteúdo da solução para lavagem concentrada 20X conforme descrito acima.
- 4.** Dissolver o calibrador conforme descrito acima e misturar suavemente.
- 5.** Deixar que os outros componentes atinjam a temperatura ambiente (aproximadamente 1 hora) e então misturar como descrito.
- 6.** Ajustar a incubadora ELISA a +37°C e preparar a lavadora ELISA rinsando com solução de lavagem diluída, de acordo com as instruções do fabricante. Configurar o número correto de ciclos de lavagem conforme descrito na validação do equipamento para uso com o kit.
- 7.** Verificar se a leitora ELISA está ligada ou certificar-se que a mesma já esteja ligada pelo menos 20 minutos antes da leitura.
- 8.** Caso esteja usando estação de trabalho automatizada, ligar e verificar a configuração e assegurar-se de usar o protocolo de ensaio correto.
- 9.** Verificar se as micropipetas estão configuradas no volume especificado.
- 10.** Verificar se todos os outros equipamentos estão disponíveis e prontos para uso.

11. Em caso de problemas, não continuar o teste e avisar o superior.

10. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

O ensaio deve ser realizado conforme abaixo relatado, tomando cuidado para manter o mesmo tempo de incubação para todas as amostras que estiverem sendo testadas.

1. Diluir as amostras 1:101 dispensando primeiramente 10µl de amostra e a seguir 1ml de diluente de amostra em um tubo de diluição; misturar delicadamente em vórtex.

2. Colocar o número necessário de microcavidades no suporte de tiras. Deixar a primeira microcavidade vazia para o “blanking”.

3. Dispensar 100µl de controle negativo em triplicata, 100µl de controle positivo em uniplicata e 100µl de calibrador em duplicata nas respectivas microcavidades. Não diluir os controles e o calibrador, pois estão prontos para o uso!

4. Dispensar 100µl das amostras diluídas nas microcavidades e então verificar se todas as mostras ficam coloridas de azul e se os controles e calibrador foram dispensados.

5. Incubar a microplaca por **60 minutos a +37°C**.

Notas importantes: as tiras devem ser seladas com o filme adesivo somente quando o teste for realizado manualmente. Não cobrir as tiras quando usar equipamento automático ELISA.

6. Aproximadamente 5 a 10 minutos antes do uso, preparar o imunocomplexo antígeno/anticorpo HAV conforme descrito previamente.

7. Lavar a microplaca 4 -5 vezes com 300µl/microcavidade com solução de lavagem diluída.

8. Pipetar 100µl do complexo antígeno/anticorpo HAV dentro de cada microcavidade, exceto na primeira microcavidade (blanking) e selar. Verificar se todas as microcavidades estão coloridas de vermelho, exceto a microcavidade **A1**.

9. Incubar a microplaca por **60 minutos a +37°C**.

10. Lavar as microcavidades conforme descrito na etapa 7.

11. Pipetar 100µl de cromógeno/substrato dentro de cada microcavidade, incluindo o blanking. A seguir, **incubar a microplaca em temperatura ambiente (18 -24°C) por 20 minutos**.

Nota importante: Não expor a incidência de luz direta, pois podem ocorrer alterações de fundo (background).

Legenda BLK=Blank NC= Controle Negativo
 CAL= calibrador PC=Controle Positivo S= amostra

12. CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO

Uma verificação é realizada nos controles/calibradores a qualquer momento que o kit é utilizado de modo a verificar se a D.O. esperada a 450nm ou valores S/CO foram alcançados na análise.

Assegurar-se que os seguintes resultados são atingidos:

Parâmetro	Requisitos
Microcavidade “blanking”	<0,050 valor D.O. a 450nm
Controle Negativo (NC) Valor Médio (NC)	<0,150 média D.O. a 450 nm após o “blank” coeficiente de variação <30%
Calibrador	S/CO > 1
Controle Positivo	>0,500 valor D.O. a 450nm

Se os resultados dos testes atingem os requisitos acima, prosseguir para a próxima Sessão.

Se não atingirem não continuar e realizar as seguintes verificações

Problema	Verificação
Microcavidade “blank” >0,050 D.O. 450nm	1. Se o cromógeno/substrato não se contaminou durante o ensaio
Controle negativo (NC) >0,150 D.O. 450nm após o “blanking” Coeficiente de variação >30%	1. Se o procedimento de lavagem e as configurações da lavadora estão validados no estudo de pré-qualificação; 2. Se foi utilizada a solução de lavagem apropriada e se a lavadora foi ativada antes do uso; 3. Se não houve erros no procedimento do ensaio (dispensação de controle positivo ao invés de controle negativo); 4. Se não houve contaminação do controle negativo ou das microcavidades onde o controle foi dispensado devido a respingos de amostra positiva ou do conjugado enzimático; 5. Se as micropipetas não foram contaminadas com amostras positivas ou conjugado enzimático; 6. Se as agulhas da lavadora não estão bloqueadas ou parcialmente obstruídas.
Calibrador S/CO <1	1. Se o procedimento foi corretamente desempenhado; 2. Se não houve erros durante a

	distribuição do controle (dispensação do controle negativo ao invés do calibrador) 3. Se o procedimento de lavagem e as configurações da lavadora foram validados no estudo de pré-diluição. 4. Se não ocorreu nenhuma contaminação externa no calibrador.
Controle positivo <0,500 D.O. 450nm	1. Se o procedimento foi corretamente desempenhado: 2. Se não houve erros durante a distribuição do controle (dispensação do controle negativo ao invés do controle positivo) 3. Se o procedimento de lavagem e as configurações da lavadora foram validados no estudo de pré-diluição. 4. Se não ocorreu nenhuma contaminação externa do controle positivo.

Se quaisquer dos problemas acima ocorrerem, relatar o problema ao supervisor para uma tomada de decisões e ações.

* Enquanto estiver usando um equipamento automático para microplacas RADIM e/ou SEAC, a leitura do espectrofotômetro será realizada automaticamente em 3 comprimentos de ondas diferentes: 450, 620 e 405nm, de modo a permitir uma faixa de curva com maior linearidade.

13. CÁLCULO DO “CUT-OFF”

Os resultados dos testes são calculados através da média do valor D.O. 450nm do Controle Negativo (NC) e um cálculo matemático, de modo a definir a fórmula de “cut-off” a seguir:

$$\text{“Cut-off”} = \text{NC} + 0,250$$

O valor encontrado para o teste é usado para interpretação de resultados conforme descrito no próximo parágrafo.

Nota importante: Quando o cálculo dos resultados é realizado operando o sistema de estação de trabalho automatizado ELISA, certificar-se que a fórmula apropriada está sendo usada para calcular o valor de “cut-off” e gerar a interpretação correta dos resultados.

14. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados são interpretados de acordo com o valor do “cut-off” e de amostra D.O> 450nm (ou S/CO) de acordo com a tabela a seguir:

Co/S	Interpretação
<0,8	Negativo
0,8 – 1,2	Ambíguo
>1,2	Positivo

Um resultado negativo indica que o paciente não foi afetado pelo HAV.

Qualquer paciente que tenha um resultado ambíguo deve ser re-testado com uma segunda amostra em 1-2 semanas após o teste da primeira amostra.

Um resultado positivo é indicativo de uma infecção passada ou recente de HAV e, portanto o paciente deve ser tratado de acordo.

Um exemplo de cálculo é relatado abaixo:

Os dados a seguir não devem ser usados ao invés dos dados reais obtidos pelo usuário:

Controle negativo: 0,050 – 0,060-0,070 D.O. 450nm
 Valor médio: 0,060 D.O. 450nm
 Menor que 0,150 Aceito

Controle positivo: 2,189 D.O. 450nm
 Maior que 0,500 Aceito

$$\text{“Cut-off”} = 0,060 + 0,250 = 0,310$$

Calibrador: 0,550-0,530 D.O. 450nm
 Valor médio: 0,540 D.O. 450nm S/Co = 1,7
 S/Co maior que 1,0 Aceito

Amostra 1 0,070 D.O.450nm
 Amostra 2: 1,690 D.O. 450nm
 Amostra 1: S/Co <0,8 = negativo
 Amostra 2: S/Co >1,2 = positivo

Notas importantes:

1. A interpretação de resultados deve ser feita pelo supervisor do laboratório para reduzir o risco de julgamentos errôneos e interpretações errôneas.
2. Qualquer resultado positivo deve ser confirmado primeiro repetindo o teste na amostra, após haver filtrado a amostra em um filtro de porosidade 0,2µm – 0,8µm para remover qualquer interferência por micropartículas. Se o resultado continuar positivo, deve ser testado por um método alternativo (teste confirmatório) antes de confirmar o diagnóstico de hepatite viral.

3. Quando os resultados dos testes são transmitidos de um laboratório para outro local, a atenção deve ser redobrada para evitar transferência errada de dados.

4. O diagnóstico de hepatite viral deve ser informada ao paciente pelo médico especializado desta área.

15. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Limite de detecção

Na ausência de um padrão definido para HAV IgM, o limite de detecção do ensaio tem sido calculado através das preparações a seguir:

1. Accurun # 121 fornecido pela Boston Biomédica Inc. – EUA
2. Accurun # 51 Fornecido pela Boston Biomédica Inc. – EUA

Estas preparações foram feitas de acordo com as instruções do fabricante, diluídos em diluente de amostra (1:100) e posteriormente diluídos em diluente de amostra para gerar uma curva limite (accurun # 121).

Os resultados do controle de qualidade estão sumarizados na tabela a seguir:

Preparo	Diluições	S/Co
Accurun # 121	1:100	5,4
	1:200	4,1
	1:400	2,8
	1:800	1,9
	1:1600	1,0
Accurun # 51	1:100	4,2

Sensibilidade clínica

A sensibilidade clínica foi testada em painéis de amostras classificadas como positivas por um método aprovado pelo FDA dos EUA.

As amostras positivas foram coletadas de pacientes portadores de infecção HAV aguda, confirmado por sintomas clínicos e análises.

Foi encontrado um valor absoluto de 100% no estudo realizado em um número total de mais de 100 amostras.

Um painel de soroconversão também foi estudado.

Os resultados obtidos por exame dos dois painéis fornecidos pelo Boston Biomédica Inc., EUA estão relatados abaixo:

Painel de soroconversão: PHT 902

Amostra	D.O. 450nm	S/Co	DiaSorin S/Co	Refer. Resultado
CTRL (-)	0,048	0,2		
CTRL (+)	1,736	5,8		
Menbro				
1	0,037	0,1	0,3	Neg
2	0,042	0,1	0,3	Neg
3	1,956	6,6	6,8	Pos
4	1,988	6,7	6,7	Pos
5	0,669	2,2	1,5	pos

Especificidade clínica

A especificidade clínica foi determinada em painéis de amostras negativas de indivíduos normais e doadores, classificados como negativos com um kit aprovado pelo FDA dos EUA.

Tanto o plasma derivado de diferentes técnicas padronizadas de preparação (citrato, EDTA e heparina) como soro foram usados para determinar a especificidade. Não foi observada nenhuma falsa reatividade devido ao método de preparação da amostra.

Amostras congeladas também foram testadas para averiguação de interferências com o desempenho do teste. Nenhuma interferência foi observada em amostras límpidas e isentas de partículas.

Foram analisadas amostras derivadas de pacientes com diferentes patologias virais (HCV, HDV, HBV, HIV) e patologias hepáticas não virais que poderiam interferir no teste.

Nenhuma reação cruzada foi observada.

O estudo de avaliação do desempenho realizado em um Centro de referência Externa em mais de 500 amostras apresentou um valor de > 98%.

Precisão

Os valores foram calculados em duas amostras, uma negativa e uma positiva baixa, examinadas em 16 replicatas em três corridas separadas. Os resultados estão sumarizados abaixo:

Teste # 1

Amostra	Negativo	Pos. baixo
D.O. 450nm	0,058	0,719
Desvio padrão	0,008	0,052
CV%	14,3	7,2

Teste # 2

Amostra	Negativo	Pos. baixo
D.O. 450nm	0,048	0,709
Desvio padrão	0,007	0,063
CV%	13,9	8,9

Teste # 3

Amostra	Negativo	Pos. baixo
D.O. 450nm	0,050	0,713
Desvio padrão	0,007	0,055
CV%	13,4	7,7

16. LIMITAÇÕES

A falsa positividade foi determinada como sendo inferior a 2% da população normal, a maioria devido a títulos altos de RF (fator reumatóide).

As amostras congeladas contêm partículas de fibrina ou agregados que podem gerar resultado falso positivos.

A contaminação bacteriana ou inativação por calor da amostra pode afetar os valores de absorvância das amostras com a conseqüente alteração do nível do analito.

Este resultado somente é absoluto para amostras analisadas individualmente e não em sistema de “pool”.

O diagnóstico de uma doença infecciosa não deve ser estabelecido com base em um único resultado. Devem ser considerados os históricos clínicos dos pacientes, sintomatológicos, assim como outros dados de diagnóstico.

17. SÍMBOLOS

Ver ao final das instruções de uso.










18. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

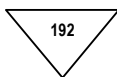
1. Dienstag J.L. “Hepatitis A Virus: identification, characterization and epidemiologic investigations”. Progress in liver disease VI, Popper E., Schaffner F. (eds), pp 343-370, New York, Gruner and Stratton, 1979.
2. Duermeier W., Van der Veen J., Koster B. “ELISA in Hepatitis A”. Lancet, I.: 823-824, 1978.
3. Parry J>V>, (1981) “Hepatitis A infection: guidelines for the development of satisfactory diagnosis”. The Institute of Medical Laboratory Sciences, 38, 303-311.
4. Lindberg J., Frosner G., Hansson B.G. et al.
5. “Serologic markers of hepatitis A and B in chronic active hepatitis”. Scandinavian Journal of gastroenterology, 13:525-527, 1978.

6. Barbara J.A., Howell D.R., Briggs M., Parry J.V. "Post transfusion hepatitis A". Lancet (1982), 1-738.
7. Zachoval R., Dienstag J.L., Purcell R.H. "Tests for hepatitis A virus antigen and antibody" in "Hepatitis A". gerety R.J. (Ed), pp 33-46, Orlando, Academic Press, Inc. 1984.

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



Data de referência



Reconstituir com



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° a 8°C
Reg ANVISA: 80103990061
Resp. Técnico: Sueli S. Nakano / CRBM - 4501