

INSTRUÇÕES DE USO – RUBÉOLA IgG

Teste de ELISA para detecção de Rubéola IgG – RG02

Teste de ELISA para determinação quantitativa de anticorpos IgG Contra o vírus da Rubéola em soro ou plasma humano.

Kit suficiente para 96 testes

SUMÁRIO

O vírus da Rubéola é um pequeno vírus envelopado esférico, com 55-60 nm de diâmetro, contendo uma cadeia única de RNA de 42 s. É o único membro do gênero Rubivirus da família Togaviridae, e só existe um sorotipo conhecido.

A detecção de anticorpos IgG e IgM específicos contra o vírus da Rubéola é importante no diagnóstico sorológico de infecções congênitas e primárias posnatais, que podem levar a graves defeitos no recém-nascido. A ausência de anticorpos IgG específicos, caracteristicamente de longa duração após infecções primárias, associada à presença de IgM específicas, é indicativa de risco.

Ensaio altamente específico para IgG anti-Rubéola dão ao clínico um teste confiável para o monitoramento do risco de infecções na gravidez e da resposta imunológica após vacinação.

PRINCÍPIO

Microplacas são recobertas com antígenos do Rubéola inativados, que na 1ª incubação “capturam” especificamente as IgG presentes na amostra diluída.

Após lavar todos os outros componentes da amostra, na 2ª incubação as IgG anti-Rubéola ligadas são detectadas pela adição de anticorpos anti-IgG humanas, marcados com peroxidase.

A enzima capturada na fase sólida, agindo na mistura de substrato/cromógeno, gera um sinal ótico proporcional à quantidade de anticorpos IgG anti-Rubéola presentes na amostra.

Tempo de Incubação: 2 horas e 20 minutos

COMPONENTES DO KIT

- Reagentes suficientes para 96 determinações.
 - Conservar entre 2 a 8°C.
1. **MICROPLACA:** 1 placa com 12 tiras com 8 pocinhos recobertos com antígenos do Rubéola.
Pronta para uso
 2. **DILUENTE DA AMOSTRA*:** 100 mL, solução protéica tamponada com conservantes.
Pronto para uso.

3. **PADRÕES DA CURVA***: Soro humano, diluído em solução protéica tamponada, contendo anticorpos IgG específicos para Rubéola nas concentrações:
PADRÃO A: 0 UI/ml: 2 mL
PADRÃO B: 10 UI/mL: 2 mL
PADRÃO C: 20 UI/mL: 2 mL
PADRÃO D: 50 UI/mL: 2 mL
PADRÃO E: 100 UI/mL: 2 mL
PADRÃO F: 250 UI/mL: 2 mL
4. **SOLUÇÃO DE LAVAGEM****: 60 mL, solução tampão com conservantes.
Preparo: Diluir 1 parte da solução concentrada para 19 partes (1+19) de água deionizada (exemplo: 10 mL+190 mL); volume total de 1200 mL.
Cristais na solução concentrada desaparecerão após aquecimento em banho-maria a 37° C.
Concentrada 20x
5. **CONJUGADO*****: 0,750 mL, anticorpo anti-IgG humano marcado com peroxidase, em solução tampão com estabilizantes e conservantes.
Preparo: Para obter o conjugado diluído, diluir 1 parte do mesmo para 19 partes (1+19) de diluente do conjugado (exemplo: 1 mL + 19 mL). Preparar somente a quantidade a ser utilizada. Agitar em vórtex antes do uso.
Concentrado 20x
6. **DILUENTE DO CONJUGADO*****: 15 mL, solução protéica tamponada com conservantes.
Pronto para uso.
7. **SUBSTRATO**: 12 mL, solução tamponada de tetrametilbenzidina (TMB) estabilizada contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂).
Pronto para uso
8. **SOLUÇÃO DE PARADA**: 15 mL, Solução de H₂SO₄ 0,3 M.
Pronta para uso
9. **FOLHAS ADESIVAS**: 2 unidades
10. **MANUAL DE INSTRUÇÕES DE USO**

* Contém 0,1% de azida sódica e 0,1% de Kathon GC

** Contém 0,1% de timerosal

*** Contém 0,2% de gentamicina e 0,1% de Kathon GC

ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

- Os reagentes e a microplaca, na embalagem original inviolada, são estáveis até a data de validade, determinada na etiqueta, se conservados entre 2 a 8 °C.
- Manter as tiras da microplaca não utilizadas na embalagem original fechada, protegidas da umidade e da luz (com o dessecante e lacrada). Depois de aberta

estável por 4 semanas respeitadas as condições recomendadas de armazenamento.

- A solução de lavagem diluída é estável por uma semana se conservada de 2 a 8 °C.
- O conjugado diluído não é estável: diluir apenas o volume necessário à realização do ensaio.

IMPORTANTE

1. Não usar reagentes após o vencimento.
2. No procedimento de lavagem usar somente a SOLUÇÃO DE LAVAGEM 20X fornecida no kit e seguir cuidadosamente as recomendações da seção INSTRUÇÕES DE LAVAGEM.

MATERIAL NÃO INCLUSO NO KIT

- Micropipetas calibradas para 10, 100 e 1000 uL. Respectivas ponteiros descartáveis
- Misturador tipo vórtex e papel absorvente.
- Água Tipo I (deionizada)
- Cronômetro
- Sistema de lavagem de placas manual ou automático com capacidade para 300uL
- Leitor de ELISA fotométrico com filtros a 450 nm e 620-630 nm

PRECAUÇÕES DE USO

Somente para o uso em diagnóstico *in vitro*.

“MATERIAIS POTENCIALMENTE INFECCIOSOS”

- Os controles, contendo componentes de natureza humana, foram testados e determinados como não-reativos para os anticorpos contra HCV e HIV. Apesar disto, não há nenhum método de teste que possa oferecer completa confiabilidade para ausência do vírus do HIV e da Hepatite B ou de outros agentes infecciosos. Portanto, estes reagentes devem ser manipulados como materiais potencialmente infecciosos, conforme Procedimentos de manipulação de Amostras Biológicas do Laboratório de Análises.
- Não devem ser utilizados componentes de diferentes lotes ou reagentes de outros fabricantes. Evitar contaminação cruzada de reagentes e amostras.
- Os restos de amostras, reagentes e líquido de descarte devem ser descontaminados com solução desinfetante, tal como hipoclorito de sódio 5%, antes de serem desprezados. Após procedimento de desinfecção, desprezar em pia com água em abundância.
- Resultados ótimos são obtidos através de rigorosa realização do teste conforme instruções dadas. Pipetagem precisa, incubação respeitando os limites de tempo e temperatura requerida é fundamental para o sucesso do teste.

COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

- Coletar as amostras de sangue e processá-las imediatamente para obtenção de soros ou plasmas sem hemólise.
- Evitar o uso de soros ou plasmas hemolisados, ictericos ou lipêmicos.
- As amostras devem ser refrigeradas de +2 a +8°C por até 7 dias, ou congeladas a -20°C por até 6 meses. Evitar congelar e descongelar mais de uma vez, pois as IgM podem ser danificadas.

PREPARAÇÃO DO TESTE

1. Antes da realização do teste, estabilizar todos os reagentes e amostras à temperatura ambiente (+20 a +25°C), e homogeneizar suavemente.

2. Diluir cada amostra de soro/plasma a ser testado com diluente da amostra, na proporção de 1+101 (exemplo: 10 µL de amostra + 1 mL de diluente), homogeneizando bem, sem provocar a formação de espuma. **Os padrões da curva são prontos para uso.**

3. Montar protocolo de identificação e orientação de aplicação das amostras e controles na placa onde será realizada a análise.

4. Deixar que a placa atinja a temperatura ambiente antes de abrir a embalagem. Separar somente as tiras necessárias à realização do teste, mantendo as restantes na embalagem plástica com dessecante, retirando o ar e fechando a embalagem hermeticamente.

5.

Método Quantitativo

Seguir a orientação abaixo para dispensar os padrões da curva **SEMPRE EM DUPLICATA**, reservar dois poços para o branco:

Reagente	Posição
Branco	A1
A	B1, C1
B	D1, E1
C	F1, G1
D	H1, A2
E	B2, C2
F	D2, E2
Amostras	a partir de F2

Método Qualitativo

Sugerimos a orientação para dispensar os seguintes padrões **SEMPRE EM DUPLICATA**, reservar um poço para o branco:

Reagente	Posição
Branco	A1
A	B1, C1
B	D1, E1
F	F1
Amostras	a partir de G1

6. Preparar a solução de lavagem diluída adicionando 60 mL da solução 20x concentrada a 1140 mL de água destilada ou deionizada, para um volume total de 1200 mL (ou volume menor, sempre na proporção de 1+19). Armazenar a temperatura ambiente.

7. Diluir o CONJUGADO 20X na proporção de 1+19 usando o diluente do conjugado(exemplo: para um volume final de 1 mL misturar 50µL de conjugado 20X em 950µL de diluente de conjugado) . Preparar somente a quantidade a ser utilizada, pois a solução não é estável por longo período. Agitar em vórtex antes do uso.

INSTRUÇÕES DE LAVAGEM

Um bom procedimento de lavagem é essencial para obter-se dado analítico correto e preciso.

Recomendamos a utilização de uma lavadora de microrplacas de ELISA de boa qualidade, mantida no mais alto grau de performance de lavagem. Geralmente, 4-5 ciclos de lavagem são suficientes para evitar reações falso-positivas e coloração de fundo.

No caso de lavagem manual, sugerimos a realização de 5 ciclos, dispensando 300 µL/poço e aspirando o líquido 5 vezes.

Em qualquer um dos casos, o líquido aspirado tem que ser tratado com solução de hipoclorito de sódio a 5 % por 24 horas anterior ao descarte.

REALIZAÇÃO DO TESTE

1. Dispensar nos pocinhos apropriados, conforme protocolo de aplicação das amostras, montado pelo manipulador da análise no Laboratório de Análises Clínicas, 100 µL de cada padrão da curva e de cada amostra (sempre em duplicata), nos respectivos pocinhos das tiras. Deixar o pocinho A1 vazio para o branco. **Atenção: cobrir com folha adesiva e incubar por 1 hora a 37 °C.**

2. Aspirar o conteúdo de todos os pocinhos e lavar 4 a 5 vezes com **300 µL da solução de lavagem diluída**. Esta etapa deve ser realizada adequadamente, para garantir resultados confiáveis e precisos. Remover o fluido restante batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente.

3. Dispensar 100 µL da solução de conjugado diluída em cada pocinho, exceto no pocinho A1 do branco. **Atenção: Cobrir com a folha adesiva e incubar por 1 hora a 37°C.**

4. Aspirar o conteúdo de todos os pocinhos e lavar 4 a 5 vezes com **300 µL da solução de lavagem diluída**. Esta etapa deve ser realizada adequadamente, para garantir resultados confiáveis e precisos. Remover o fluido restante batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente.

5. Dispensar 100 µL do cromógeno/substrato em todos os pocinhos inclusive no branco. Cobrir novamente e incubar por exatamente **20 minutos à temperatura ambiente** (+20 a +25°C), ao abrigo da luz.

IMPOPRTANTE: Amostras altamente positivas podem causar precipitação escura que não interfere no resultado do teste.

6. Adicionar 100 µL da solução de parada a todos os pocinhos (inclusive no branco), para interromper a reação.

7. Ler a absorbância a 450 nm com o leitor de ELISA dentro de no máximo 30 minutos. Usar o pocinho A1 como "branco" para zerar o aparelho ou, quando isso não for possível, descontar o valor do "branco" de todos os valores medidos.

CONTROLE DE QUALIDADE

O teste executado é considerado **válido** desde que os seguintes critérios sejam observados:

DO450 nm do Branco	< 0,100
Depois de descontado o branco, o valor médio da DO450 nm do Padrão A (0 UI/mL)	< 0,200
Depois de descontado o branco, o valor médio da DO450 nm do Padrão F (250 UI/mL)	> 1,000
Depois de descontado o branco, o valor médio da DO450 nm do Padrão B (10 UI/mL)	> Padrão A + 0,100

CÁLCULO DOS RESULTADOS

Quando não for possível zerar o aparelho, descontar o valor da Absorbância do branco das demais Absorbâncias obtidas.

Calcular o **valor médio** dos padrões da curvas usando a fórmula a seguir:

$$VM = \frac{(Abs1 + Abs2)}{2}$$

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Método quantitativo

Para obter resultados quantitativos em UI/mL, fazer um gráfico com os valores de Absorbância dos padrões (eixo vertical Y) contra a concentração correspondente (eixo horizontal X). Estabeleça a Curva Padrão através do ajuste da curva utilizando um programa estatístico qualificado.

Os resultados em UI/mL para cada amostra são obtidos pela projeção da respectiva absorbância média sobre a Curva Padrão.

Para monitoramento da gravidez e de outros indivíduos em risco o **Cut Off (CO)** considerado é de **10 UI/mL (Padrão B)**. Assim:

Valores (médios) de Absorbância dos soros acima de 10 UI/mL.	POSITIVO
Valores (médios) de Absorbância dos soros abaxio de 10 UI/mL.	NEGATIVO

IMPORTANTE: Amostras muito reativas que apresentarem absorbâncias superiores ao último ponto da Curva Padrão devem ser determinados como: **> 250 UI/mL.**

Método qualitativo

Para obter resultados qualitativos, calcular a razão (VM/CO) entre a absorbância média de cada amostra (VM) e o valor do cutoff (CO).

A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a seguinte tabela:

VM/CO	Interpretação
< 0,9	Negativo
0,9 – 1,1	Indeterminado
> 1,1	Positivo

No caso de indeterminação repetir o teste posteriormente, em 2 a 4 semanas, com novas amostras.

LIMITAÇÕES DO TESTE

O resultado do teste obtido utilizando este kit serve apenas como auxiliar ao diagnóstico clínico e deve ser interpretado associando-se às histórias clínicas dos pacientes, achados clínicos e outros procedimentos de diagnóstico.

Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios para interpretação dos testes, baseando-se na população em estudo.

Amostras lipêmicas, ictéricas e hemolizadas podem causar resultados errôneos, portanto, não devem ser utilizadas.

PERFORMANCES

Sensibilidade

A sensibilidade do ensaio foi calculada usando o Padrão Internacional da WHO para Rubéola. O teste apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 10 UI/mL.

Especificidade

A especificidade do ensaio foi calculada usando um painel de amostras negativas de soro e plasma testados com um kit comercial de referência. O teste apresenta sensibilidade maior de 99%.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do ensaio foi calculada usando os controles 0 e 250 UI/mL testados em réplicas em diferentes dias. Um coeficiente de variação entre 4-12% foi obtido dependendo dos valores de OD450nm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Engvall E & Perlmann P. J Immunochem 8: 871, 1971.

Engvall E & Perlmann P. J Immunol 109: 129, 1971.

Leinikki PO et al. J Clin Microbiol 8: 418, 1978.

Piroid E et al. Révue Méd Vet 131: 25, 1980.

FABRICADO POR: **BTI – Bio Tecnologia Industrial Ltda**
CNPJ: 03.654.699/0001-00 SAC (31) 3486 4674 – bti@biominas.org.br
Av. José Cândido da Silveira 2100 – sls 09, 10 e 18 - Horto
Cep: 31.170-000 - Belo Horizonte – MG – Brasil
Resp. Técnico: Dr. Luiz Eduardo De Nicola - CRBM 1452.
MS: 8004957.0075