

INSTRUÇÕES DE USO

Teste de ELISA para detecção de Rubéola IgM – RM01

Teste de ELISA para determinação qualitativa de anticorpos IgM contra o vírus da Rubéola em soro ou plasma humano.

Kit suficiente para 96 determinações

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 pós-natal, que podem levar a graves defeitos no recém-nascido. A ausência de anticorpos IgG específicos, de longa duração após infecções primárias, associadas à presença de IgM específicas, é indicativa de risco.

Ensaio de captura altamente específicos para IgM anti-Rubéola dão ao clínico um teste confiável para o monitoramento de infecções primárias durante a gravidez.

PRINCÍPIO

Microplacas são recobertas com anticorpos monoclonais anti-IgM humanas, que na 1ª incubação "capturam" especificamente essa classe de anticorpos.

Após lavar todos os outros componentes da amostra, na 2ª incubação as IgM anti-Rubéola ligadas são detectadas pela adição de antígenos do Rubéola purificados, complexados a anticorpos monoclonais específicos marcados com peroxidase.

A enzima capturada na fase sólida, agindo com cromógeno/substrato, gera um sinal óptico proporcional à quantidade de anticorpos IgM 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 anticorpos monoclonais anti IgM humana. Embalagem selada com dessecante.
Pronta para uso.
 2. **DILUENTE DA AMOSTRA*:** 100 mL, solução protéica tamponada com conservantes.

Pronta para uso.

3. **CONTROLE POSITIVO***: 2 mL, soro humano contendo anticorpos IgM específicos para Rubéola, diluído em solução tampão com conservantes.
Pronto para uso.
4. **CONTROLE NEGATIVO***: 2 mL, soro humano isento de anticorpos IgM específicos para Rubéola, diluído em solução tampão com conservantes.
Pronto para uso.
5. **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
6. **CONJUGADO*****: 0,750 mL, anticorpos monoclonais anti-Rubéola marcados com peroxidase, em solução tampão com estabilizantes e conservantes.
Concentrado 20x
7. **DILUENTE DE ANTÍGENO/CONJUGADO*****: 15 mL, solução protéica tamponada com conservantes.
Pronto para uso.
8. **ANTÍGENO**: 6 frascos, antígenos liofilizados de Rubéola em solução protéica tamponada.
Preparo: Dissolver o antígeno de um frasco em 1,9 mL de diluente de antígeno/conjugado, adicionar 0,1 mL do conjugado concentrado e misturar gentilmente no vórtex.
Conservar o volume excedente a -20°C.
9. **SUBSTRATO**: 12 mL, solução tamponada de tetrametilbenzidina (TMB) estabilizada contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂).
Pronto para uso
10. **SOLUÇÃO DE PARADA**: 15 mL, Solução de H₂SO₄ 0,3 M.
Pronta para uso
11. **FOLHAS ADESIVAS**: 2 unidades
12. **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

1. 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.
2. 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.
3. A solução de lavagem diluída é estável por uma semana entre 2 a 8 °C.
4. O Imunocomplexo não é estável. Preparar somente a quantidade a ser utilizada. O volume excedente deve ser armazenado a – 20 °C podendo ser utilizado normalmente em outras reações. Evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento.

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 controles são prontos para uso.**

3. Montar protocolo de identificação e orientação de aplicação das amostras e controles na placa onde realizar-se-á 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. Seguir a orientação abaixo para dispensar o controle positivo (CP) e negativo (CN) **SEMPRE EM DUPLICATA**, reservar um poço para o branco:

Reagente	Posição
Branco	A1
CP	B1, C1
CN	D1, E1
Amostras	a partir de F1

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. Preparar o imunocomplexo entre antígeno e conjugado, dissolvendo o antígeno de um frasco com 1,9 mL de diluente de antígeno/conjugado, adicionando 0,1 mL do conjugado concentrado e misturando gentilmente no vórtex. Esta operação deve ser realizada logo após a preparação das placas com as amostras. Misturar gentilmente

no vórtex antes do uso. Preparar somente a quantidade necessária para uso. Volumes excedentes devem ser armazenados a – 20 °C.

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 micorplacas 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-positivos e coloração de fundo.

No caso de lavagem manual, sugerimos a realização de 5 ciclos, dispensando 300 uL/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 controle positivo, controle negativo 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 do imunocomplexo (antígeno + conjugado em solução diluente) 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

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 do substrato (A1)	< 0,100
Depois de descontado o branco (A1), o valor médio da DO450 nm do Controle Negativo (CN)	< 0,200
Depois de descontado o branco (A1), o valor médio da DO450 nm do Controle Positivo (CP)	> 1,000

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 controles negativos e positivos usando a fórmula a seguir:

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

Se o teste tornar-se válido, calcular o valor do **cutoff (CO)** pela fórmula:

$$CO = CN + 0,250$$

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Valores (médios) de Absorbância dos soros maiores que CO + 20% .	POSITIVO
Valores (médios) de Absorbância dos soros entre CO e CO + 20% .	INDETERMINADO
Valores (médios) de Absorbância dos soros menores que CO .	NEGATIVO

OBSERVAÇÕES IMPORTANTES

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

No monitoramento de gravidez para infecções primárias de Rubéola, qualquer resultado positivo deve ser confirmado pelo monitoramento do aumento de positividade e soroconversão para IgG. De toda forma, correr um teste confirmatório fornecido nas instruções de uso deste kit.

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.

Mesmo que a técnica de ELISA por "imunocaptura" seja considerada mais específica que a técnica de "sanduíche", pode ocorrer 1 a 2% de falsos positivos.

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

CONFIRMAÇÃO DO TESTE

1. Dispensar nos pocinhos apropriados 100 µL dos controles (em duplicata), e da suposta amostra positiva diluída (em duplicata). Proceder conforme descrito nos itens 1 e 2 da Realização do teste.
2. Dissolver o conjugado concentrado no diluente de antígeno/conjugado, na proporção de 1+19, **sem adicionar o antígeno**. Dispensar 100 µL do conjugado diluído nos pocinhos, exceto em A1. Proceder conforme descrito no restante do procedimento.
3. Se a Abs da amostra supostamente positiva for, neste caso, menor que o cut-off, a reatividade é específica e a positividade está confirmada. Se for maior que o cut-off, mesmo na ausência do antígeno de *T. gondii*, a reatividade não é específica e a positividade não está confirmada.

PERFORMANCES

Sensibilidade

A sensibilidade do ensaio foi calculada usando um painel de amostras positivas e soroconvertidas, testadas com um kit comercial de referência. O teste apresenta sensibilidade maior de 98%.

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 negativos e positivos testados em réplicas em diferentes dias. Um coeficiente de variação entre 4-12% foi obtido dependendo dos valores de OD 450nm.

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. Rêvue Méd Vet 131: 25, 1980.

Vaheri A et al. J Med Virol 5: 171, 1980.

Vejtorp M et al. Acta Path Microbiol Scand 88: 349, 1980.

Voller A et al. Brit J Exp Pathol 56: 338, 1975.

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: 8004957.0026