

Bioclin

BIOLISA RUBÉOLA IgM

K 124 - 1

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

Teste para determinação qualitativa de anticorpos IgM para Rubéola em soro ou plasma humano por enzimaensaio em microplaca. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaensaio ou imunoenzimática.

O KIT BIOLISA RUBÉOLA IgM é um ensaio imunoenzimático em fase sólida baseado no princípio de imunocaptura para a detecção qualitativa de anticorpos IgM para Rubéola em soro ou plasma humano. Anticorpos IgM para Rubéola presentes na amostra, ligam-se aos anticorpos que revestem a microplaca formando complexos anti-IgM humanos - anticorpos IgM anti-Rubéola. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. O conjugado enzima-antígeno de Rubéola é adicionado à microplaca e então incubado.

O Conjugado se liga ao Complexo imobilizado anti-IgM humana - anticorpos IgM anti-Rubéola presentes. É realizada nova lavagem para remover os excedentes. Após esta etapa, os Substratos A e B são adicionados e incubados, produzindo uma cor azul, que indica a quantidade de anticorpos IgG presentes nas amostras. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação havendo uma mudança de cor para amarelo, medida em um leitor de microplacas.

REAGENTES

1. Placa Sensibilizada.

Estocar entre 2 e 8° C.

2. Conjugado

Antígenos recombinantes de Rubéola ligados a peroxidase; conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

3. Lavagem Concentrada (50x)

Solução tampão, surfactante e conservante.

4. Diluente de Amostra

Solução tampão; conservante. Estocar entre 2 e 8° C

5. Substrato A

Solução tampão contendo peróxido de hidrogênio; conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

6. Substrato B

Tampão contendo tetrametilbenzidina (TMB); conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

7. Solução de Parada

Ácido clorídrico 1M. Estocar entre 2 e 8° C.

8. Calibrador Cut-Off

Anticorpos IgM anti-Rubéola diluídos; conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

9. Controle Negativo

Anticorpos IgM não reativos para Rubéola; conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

10. Controle Positivo

Anticorpos IgM anti-Rubéola; conservante. Estocar entre 2 e 8° C.

11. Seladores de Placa

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	1	2	3
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades
1- Placa sensibilizada	1 Unidade (96 cavidades)	2 Unidades (96 cavidades)	5 Unidades (96 cavidades)
2- Conjugado	1 Frasco X 12 mL	2 Frascos X 12 mL	5 Frascos X 12 mL
3- Lavagem Concentrada	1 Frasco X 20 mL	2 Frascos X 20 mL	4 Frascos X 20 mL
4- Diluente de Amostra	1 Frasco X 12 mL	2 Frascos X 12 mL	5 Frascos X 12 mL
5- Substrato A	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	5 Frascos X 8 mL
6- Substrato B	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	5 Frascos X 8 mL
7- Solução de Parada	1 Frasco X 8 mL	2 Frascos X 8 mL	4 Frascos X 8 mL
8- Calibrador Cut-Off	1 Frasco X 1 mL	2 Frascos X 1 mL	4 Frascos X 1 mL
9- Controle Negativo	1 Frasco X 1 mL	2 Frascos X 1 mL	4 Frascos X 1 mL
10- Controle Positivo	1 Frasco X 1 mL	2 Frascos X 1 mL	4 Frascos X 1 mL
11- Seladores de Placa	3 unidades	5 unidades	10 unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instruções de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos nos Kit:

- 1- Pipetas capazes de dispensar volumes de 5, 50 e 100µL com precisão maior que 1,5%.
- 2- Repipetador para pipetagens repetitivas de volumes de 100µL e 300µL, com precisão maior que 1,5% (opcional) ou pipeta multicanal.
- 3- Lavadora de microplaca (opcional).
- 4- Leitora de ELISA com capacidade de absorvância em 450 e 630 nm de comprimento de onda.
- 5- Pipetas com volumes reguláveis (200µL a 1000µL) para preparação do Substrato.
- 6- Tubos de ensaio para a preparação dos Substrato A e B.
- 7- Papel absorvente para secar as microcavidades.
- 8- Cronômetro ou relógio.
- 9- Frasco para estocar a Solução de Lavagem após diluída.
- 10- Água destilada ou deionizada.
- 11- Ferramentas de Controle de Qualidade.
- 12- Incubadora de 37 ° C ± 2 ° C.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. O transporte em temperaturas entre 15 e 30°C não deverá exceder a 72 (setenta e duas) horas. **Não congelar.** Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1 - Somente para uso diagnóstico *in vitro*;
- 2 - Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos;
- 3 - O envelope contendo as tiras deve ser aberto somente após atingir a temperatura ambiente. Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no invólucro de alumínio, vedar e estocar a 2-8°C.
- 4 - A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes;
- 5 - Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos e agentes oxidantes e redutores, que podem alterar de forma significativa os resultados;
- 6 - O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se os critérios de biossegurança de acordo com a legislação vigente.
- 7 - Toda matéria-prima do produto é testada e deve ser não reagente para HBsAg, Anti-HIV 1&2 e Anti HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação manual de todo produto que contém soro é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.
- 8 - Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.
- 9 - Por medida de proteção, pode-se cobrir a placa durante a reação. Caso opte por este procedimento, é necessário que seja estabelecido como rotina.
- 10 - Deve-se assegurar que o fundo da cavidade esteja limpo e seco e que não haja bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa. Não permitir que as cavidades sequem durante o ensaio.
- 11 - Não exponha os reagentes, especialmente o substrato, à luz forte ou vapores de hipoclorito durante armazenamento ou etapas de incubação.
- 12 - A Solução de Parada contém ácido clorídrico, que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com devido cuidado.

AMOSTRAS

Utilizar soro ou plasma (EDTA ou Heparina).

Amostras hemolisadas ou altamente lipêmicas não devem ser usadas.

As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8°C, pelo período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 5 dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20°C (freezer).

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

1) Solução de Lavagem:

Diluir o conteúdo do frasco nº 3 (Lavagem Concentrada) em 1000mL de água destilada ou deionizada. Estocar entre 2 e 8° C até a data de validade impressa no frasco original. Pode ser armazenada em temperatura ambiente. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37 ° até dissolução.

2) Substrato – Solução de Trabalho

Determinar a quantidade de cavidades a serem utilizadas para preparo de um volume adequado. Preparar a solução misturando partes iguais do Substrato A e Substrato B, 15 minutos antes de sua utilização. Mantenha-o protegido da luz até ser utilizado.

Para cada microcavidade (teste), utilizar:

50µL de Substrato A + 50µL de Substrato B

Por exemplo: misture 1 mL de Substrato A e 1 mL de Substrato B para duas tiras de 8 microcavidades (16 testes). Ocorre sobra de reagente.

TÉCNICA

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, amostras e controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 – 30 ° C) por no mínimo 40 minutos.

Retornar as tiras da micro placa que não foram utilizadas para a embalagem original selada.

- 1-Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Calibrador, controles e amostras. (podendo ser testadas em duplicata).
 - 2- Separar a primeira cavidade para Branco (OPCIONAL).
 - 3-Adicionar 100µL de calibrador de controle negativo, controle positivo nas cavidades determinadas.
 - 4-Pipetar 100µL de Diluente de Amostra nas cavidades determinadas para as amostras e em seguida, pipetar 5µL de amostra.
 - 5- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Ocorre mudança de cor de verde para azul nas cavidades das amostras.
 - 6- Cobrir as cavidades com o selador de placa.
 - 6- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 ° C ± 2 ° C.
 - 7- Retirar o selador de placa das cavidades;
 - 8- Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora) ou por decantação (manual); Usar 300µL aproximadamente de Solução de Lavagem, previamente diluída, para efetuar um total de cinco (5) Ciclos de lavagem.
- Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.

Nota: Lavagem/ secagem deficiente pode causar resultados inadequados.

- 9- Pipetar 100µL de Conjugado em cada cavidade exceto na cavidade do branco (se tiver feito a opção).
- 10- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
- 11- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora 37°C ± 2 ° C.
- 12- Retirar o selador de placa das cavidades.
- 13- Repetir o item 8.

14- ATENÇÃO Siga um dos seguintes procedimentos:

A) Pipetar 100µL de substrato previamente preparado* – Solução de trabalho (A+ B) em cada cavidade.
VIDE PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO.

Ou

B) Pipetar 50µL de Substrato A em cada cavidade.
Pipetar 50µL de Substrato B em cada cavidade.

- 15- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
- 16- Incubar por 10 minutos ± 1 minuto em uma incubadora a 37 ° C ± 2 ° C.
- 17- Retirar o selador de placa das cavidades.
- 18- Pipetar 50 µL de Solução de Parada em cada cavidade.
- 19- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.
- 20- Leia a 450nm (filtro primário) / 630nm (filtro secundário) em até no máximo 30 minutos.

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura do Branco, Controles e Calibrador estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

ITEM	ABSORBANCIA
Cavidade Branco	< 0,050
Controle Negativo	< 0,100
Calibrador Cut-Off	> 0,150 e < 0,450
Controle Positivo	> 0,500

As absorbâncias para os controles e calibradores foram obtidas após a diminuição da absorbância do branco. Para a leitura em filtro único (450 nm) considerar limite de branco < 0,100. Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir a técnica.

DESCRIÇÃO DOS CÁLCULOS

QUALITATIVO

Considerar como Cut-Off a absorbância média obtida com o Calibrador Cut-Off.

ITEM	ABSORBANCIA
Calibrador Cut-Off	A1 = 0,250
	A2 = 0,260
Absorbância média do Calibrador Cut-Off	$(0,250 + 0,260) / 2 = 0,255$

Calcular o Índice dividindo a absorbância da amostra pelo valor de Cut-Off.

Exemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Amostra	0,812
Valor de Cut-Off	0,255
Índice: Amostra/ Valor de Cut-Off	$0,812 / 0,255 = 3,18$

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

RESULTADOS	QUALITATIVO
	ÍNDICE
Negativo	< 0,9
Positivo	> 1,1
Indeterminado	$\geq 0,9$ e $\leq 1,1$

Observação: No caso de resultado indeterminado, a amostra deve ser reanalisada. As amostras que obtiverem resultados repetidamente indeterminados devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados permanecerem indeterminados, deve-se coletar uma nova amostra em duas semanas. Se a nova amostra for positiva, a amostra deve ser considerada positiva.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A interpretação de um teste diagnóstico, não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Devem-se incluir outros testes de confirmação, antes que uma amostra seja considerada positiva. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição. Enfim, todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve estabelecer valores de referência para os controles em níveis baixo, normal e elevado para monitorar a performance do teste.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Exatidão

Sensibilidade e Especificidade Clínica

O Kit BIOLISA Rubéola IgM analisou amostras clínicas em comparação com outro método de EIA. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do Kit BIOLISA Rubéola IgM é 90,0%, e a especificidade clínica é de 94,9%.

BIOLISA RUBÉOLA IgM EIA x EIA REFERÊNCIA

MÉTODO	RESULTADO	EIA REFERÊNCIA		TOTAL
		POSITIVO	NEGATIVO	
BIOLISA-Rubéola IgM EIA	POSITIVO	9	3	12
	NEGATIVO	1	56	57
	RESULTADO TOTAL	10	59	69

Sensibilidade Clínica: 90,0% (55,5 - 99,8%) *

Concordância global: 94,2% (85,8 - 98,4) * Especificidade Clínica: 94,9% (85,8 - 98,9%) *

*95% Intervalo de confiança

Precisão

REPETIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens sucessivas com três amostras, utilizando o mesmo lote, obtendo-se os seguintes resultados:

Amostra	Repetibilidade		
	1	2	3
Média	0,764	1,920	4,489
Desvio padrão	0,029	0,074	0,171
Coefficiente de variação (%)	3,807	3,879	3,807

REPRODUTIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens durante 3 dias consecutivos com três amostras, utilizando o mesmo lote, obtendo-se os seguintes resultados:

Amostra	Reprodutibilidade		
	1	2	3
Média	0,754	1,926	4,420
Desvio padrão	0,009	0,010	0,062
Coefficiente de variação (%)	1,179	0,510	1,403

SIGNIFICADO CLÍNICO

A Rubéola é um vírus de RNA, esférico, envelope pequeno, pertencente à família Togaviridae. É vulgarmente conhecido como alemão ou sarampo de 3 dias. A infecção pelo vírus de Rubéola é transmitida através de gotículas de saliva, resultando em erupção contagiosa leve em crianças ou jovens adultos.

Na infância, a infecção é uma doença auto-limitante, benigna, caracterizada por febre baixa, dor de cabeça, linfadenopatia, artralgia e conjuntivite. No entanto, a infecção durante a gravidez, especialmente no primeiro trimestre, pode levar ao aborto espontâneo, infecção intra-uterina causando a morte fetal, ou anomalias congênitas.

A Rubéola congênita depende do período em que a infecção ocorre e pode resultar em complicações graves, incluindo a surdez, problemas oculares, incluindo cataratas e glaucoma, cardiopatia congênita e retardo mental. Os anticorpos IgM contra a rubéola são produzidos inicialmente, podendo atingir níveis detectáveis dentro de 2-3 dias e pico de 14-21 dias após o início dos sintomas que permanecem detectáveis durante as próximas 4-8 semanas. O diagnóstico de infecção ativa ou recente pode ser obtido pela presença de anticorpos IgM em amostra inicial. Depois de vários dias, os anticorpos IgG aparecem depois da IgM, com pico de 14-21 dias, persistindo níveis variados para toda a vida. A presença de anticorpos IgG anti-Rubéola é indicativo de infecção prévia e/ou imunidade.

NÚMERO DE TESTES

Apresentação 1 – 96 testes

Apresentação 2 – 192 testes

Apresentação 3 – 480 testes

BIBLIOGRAFIA

- Herrmann, KL. Rubella Virus. In: Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology 4th Edition (1985) 779-784.
- Turgeon, ML. Rubella Infection. In: Immunology and Serology in Laboratory Medicine. 2nd Edition (1996). 275-286.
- Chernesky, MA, Mahony JB. Rubella Virus. In: Manual of Clinical Microbiology. 6th Edition (1995) 968-973.
- Voller, A, Bidwell, DE. A simple Method for Detecting Antibodies to Rubella. Brit. J. Exp. Pathol. (1975) 56:338-339.
- Rawls WE, Chernesky MA. Rubella Virus. Manual Clinical Immunology (1976) 452-455.
- Millian, SJ, Wegman D. Rubella Serology: Applications, Limitations, and Interpretations. Amer. J. Pub. Health (1972) 170-176
- Bioclin – Dados de arquivos

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes **Bioclin** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

DADOS DO FABRICANTE

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca

CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil

Tel.: (31) 3439.5454 - Fax (31) 3439.5455

e-mail bioclin@bioclin.com.br

CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente

Tel.: 0800 0315454.

e-mail: sac@bioclin.com.br

Número de Registro do Kit Biolisa Rubéola IgM na ANVISA: 10269360190

Revisão: Junho/11