

RIDASCREEN[®] Candida IgA, IgG, IgM

N.º do art.: K9011 (IgA)

K9021 (IgG)

K9031 (IgM)



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemanha
phone.: +49 61 51 81 02-0 / fax: +49 61 51 81 02-20



1. Finalidade

Para diagnóstico *in vitro*. Os testes RIDASCREEN® Candida são enzima-imuno-ensaios para a detecção quantitativa de anticorpos IgA, IgG ou IgM contra *Candida albicans* e espécies *Candida* relacionadas antigenéticas no soro humano.

O teste deve ser feito no caso de suspeita fundada de uma infecção com *Candida* ou para o esclarecimento do estado imunitário.

2. Resumo e explicação do teste

Por causa da reação do sistema imunitário, ocorre, após uma infecção com *Candida*, a formação de anticorpos específicos contra o agente patogênico. Estes podem ser comprovados no soro com a ajuda de processos imunológicos. Para o significado de um teste, além da seleção do antígeno utilizado específico do agente patogênico, o método de teste utilizado também é importante.

3. Princípio do teste

Antígenos limpos são colocados em uma microplaca. Nas amostras dos pacientes, os anticorpos presentes se ligam aos antígenos e são, numa segunda etapa, comprovados com um anticorpo anti-humano marcado com enzima (conjugado). Através da enzima, um substrato sem cor (H_2O_2/TMB) é convertido em um produto final azul. A reação enzimática é finalizada com a adição de ácido sulfúrico. Com isso, ocorre simultaneamente a mudança da cor de azul para amarelo. A posterior medição é feita com um fotômetro a 450 nm (comprimento de onda de referência ≥ 620 nm).

4. Conteúdo da embalagem

Tab.1: Conteúdo da embalagem (Os reagentes de uma embalagem são suficientes para 96 testes)

			K9011 IgA	K9021 IgG	K9031 IgM
Plate	96 testes	Microplaca; 12 tiras (divisíveis) no quadro de suporte; revestidas com antígenos de <i>Candida albicans</i>	X	X	X
SeroPP	110 ml	Tampão de amostra, pronta para o uso; solução NaCl tamponada de fosfato, de cor amarela;	X	X	X
SeroWP	100 ml	Tampão de lavagem, conc. de 10X; solução de NaCl tamponada 3X;	X	X	X
Control IgA + Tampa azul	2,5 ml	Controlo padrão IgA, pronto para o uso; soro humano diluído, de cor azul;	X		
Control IgG + Tampa verde	2,5 ml	Controlo padrão IgG, pronto para o uso; soro humano diluído, de cor verde;		X	
Control IgM + Tampa vermelha	2,5 ml	Controlo padrão IgM, pronto para o uso; soro humano diluído, de cor vermelha;			X
Control IgA - Tampa transparente	1,2 ml	Controlo negativo IgA, pronto para o uso; soro humano diluído;	X		
Control IgG - Tampa transparente	1,2 ml	Controlo negativo IgG, pronto para o uso; soro humano diluído;		X	
Control IgM - Tampa transparente	1,2 ml	Controlo negativo IgM, pronto para o uso; soro humano diluído;			X
Control IgA A Tampa azul	1,2 ml	Controlo de qualidade A IgA, pronto para o uso; soro humano diluído;	X		
Control IgA B Tampa azul	1,2 ml	Controlo de qualidade B IgA, pronto para o uso; soro humano diluído;	X		
Control IgG A Tampa verde	1,2 ml	Controlo de qualidade A IgG, pronto para o uso; soro humano diluído;		X	
Control IgG B Tampa verde	1,2 ml	Controlo de qualidade B IgG, pronto para o uso; soro humano diluído;		X	
Control IgM A Tampa vermelha	1,2 ml	Controlo de qualidade A IgM, pronto para o uso; soro humano diluído;			X
Control IgM B Tampa vermelha	1,2 ml	Controlo de qualidade B IgM, pronto para o uso; soro humano diluído;			X
SeroA HD tampa azul	12 ml	Conjugado IgA anti-humano HD (cabra), pronto para o uso; anticorpos conjugados com peroxidase em sol. proteica;	X		
SeroG HD Tampa verde	12 ml	Conjugado IgG anti-humano HD (cabra), pronto para o uso; anticorpos conjugados com peroxidase em sol. proteica;		X	

SeroM HD <i>Tampa vermelha</i>	12 ml	Conjugado IgM anti-humano HD (cabra), pronto para o uso; anticorpos conjugados com peroxidase em sol. proteica;			X
SeroSC	12 ml	Substrato, H ₂ O ₂ / tetrametilbenzidina; pronto para o uso	X	X	X
Stop	12 ml	Reagente bloqueador, 1 N ácido sulfúrico; pronto para o uso	X	X	X

Detalhes sobre substâncias perigosas de acordo com as obrigações de rotulagem. Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com

5. Reagentes e a sua armazenagem

O kit deve ser armazenado de 2 - 8 °C e pode ser utilizado até a data de validade impressa no rótulo. Solução de lavagem diluída pode ser utilizada por no máximo 4 semanas quando armazenadas de 2 - 8 °C ou por uma semana quando armazenados em temperatura ambiente (20 - 25 °C). A garantia do kit não é válida após o vencimento do kit.

O saco de alumínio, no qual a microplaca se encontra, deve ser aberto de um modo que o fecho zipper não seja arrancado. As tiras não necessárias devem ser armazenadas no saco de alumínio fechado a 2 – 8 °C.

Uma contaminação do reagente deve ser evitada bem como a luz direta sobre o substrato incolor.

6. Reagentes e equipamentos adicionais necessários

6.1. Reagentes

água destilada ou deionizada

6.2. Equipamento

- Incubador a 37 °C
- Tubos de amostra
- Vortex
- Micropipetas para volumes de 10 – 100 µl e 100 – 1000 µl
- Proveta graduada (1000 ml)
- Cronômetro
- Aparelho de lavagem para as microplacas ou pipetas de vários canais
- Fotômetro para as microplacas (450 nm, filtro de referência ≥ 620 nm)
- Filtro de papel (lenços de laboratório)
- Contentor para lixo com uma solução de hipoclorito de 0,5%

7. Medidas de precaução

Somente para diagnóstico *in vitro*.

Este ensaio só deve ser realizado por profissionais de laboratório treinados. As diretrizes para trabalhar em laboratórios médicos devem ser seguidas. O manual de instruções relativo ao procedimento de ensaio deve ser seguido. Não pipete amostras ou reagentes com a boca. Evite o contato com a pele ferida ou membranas mucosas. Ao manusear reagentes ou amostras, use roupas de segurança adequadas (luvas apropriadas, jaleco, óculos de segurança) e lave suas mãos após o término do procedimento de ensaio. Não fume, coma ou beba nas áreas onde estão sendo usadas amostras ou reagentes.

Os soros de controle contidos no kit (controle padrão, controle negativo, controle de qualidade A e controle de qualidade B) foram testados para HIV e HCV-Ak, bem como HbsAg, e considerados negativos. Porém, eles devem, bem como as amostras de pacientes e todos os materiais que entrem em contato com eles, ser considerados como potencialmente infecciosos e manejados de acordo com as respectivas regras de segurança nacionais.

Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com

Todos os reagentes e materiais utilizados devem ser descartados corretamente após o uso. Consulte os regulamentos nacionais relevantes para a eliminação.

8. Coleta e armazenagem das amostras

O teste é desenvolvido para a análise de amostras de soro humano. Após a coleta de sangue, o soro deve ser rapidamente tirado do coágulo para evitar uma hemólise do soro. As amostras devem ser armazenadas frias ou congeladas até serem usadas para o teste. Deve-se absolutamente evitar um novo congelamento e descongelamento, bem como a contaminação microbiana. A utilização de amostras escurecidas, ictéricas, hemolíticas, lipemicas inativadas do calor pode produzir falsos resultados.

Tab. 2: Armazenagem das amostras

soro não diluído		Soro diluído
2 – 8 °C	–20 °C	2 – 8 °C
1 semana	> 1 semana	7 horas

9. Execução do teste

9.1. Generalidades

Antes da utilização, todos os reagentes e as tiras deve ser colocados em temperatura ambiente (20 – 25 °C). As tiras só devem ser retiradas do saco de alumínio após a temperatura ambiente tiver sido alcançada. Os reagentes devem ser misturados imediatamente antes da utilização. Após a utilização, o kit deve ser armazenado novamente a 2 – 8 °C.

Só deve ser retirada a quantidade de reagente necessária para a execução do teste. O reagente restante não deve ser colocado de volta nos frascos, pois isto pode levar a uma contaminação.

As tiras não podem ser usadas mais de uma vez. Os reagentes e as tiras não devem ser utilizadas se a embalagem estiver danificada ou os frascos com derrames.

Alguns dos reagentes contidos no kit não são específicos ao teste. Estes reagentes marcados com Sero (por ex. **SeroPP**) podem também ser utilizados em outros ensaios RIDASCREEN® Sero ELISA com os respectivos reagentes.

Os soros de controle são específicos do lote. Uma substituição dos soros de controle entre os kits de número de lotes diferentes não é permitida.

RIDASCREEN® Sero ELISA controlos de qualidade A e B, são fornecidos como componentes adicionais aos respectivos kits RIDASCREEN® Sero ELISA. São controlos propostos para um controlo de qualidade adicional que podem ser utilizados como opção. Contêm soro humano de controlo com diferentes concentrações de anticorpos.

9.2. Preparação do tampão de lavagem

1 parte do concentrado do tampão de lavagem **SeroWP** é misturada com 9 partes de água destilada. Para isso, coloca-se 100 ml do concentrado numa proveta graduada a de 1000 ml e enche-se com 1000 ml de água destilada. Cristais eventualmente disponíveis no concentrado devem ser dissolvidos anteriormente com calor (banho-maria a 37 °C). Solução de lavagem diluída pode ser utilizada por no máximo 4 semanas quando armazenadas de 2 - 8 °C ou p por uma semana quando armazenados em temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.3. Preparação das amostras

As amostras de soro a serem examinadas serão diluídas antes do início do teste com o tampão de amostra **SeroPP**. Por favor, observe as diferentes diluições para a dosagem de IgA, IgG e IgM.

Para todas as classes de anticorpos, pode ser produzida uma pré-diluição conjunta (1 : 10):

Diluir a 1 : 200 para a amostra do soro para a dosagem de IgM:

p. ex.: 10 µl de soro + 90 µl de tampão de amostra (1 : 10)
10 µl dos quais + 190 µl de tampão de amostra (1 : 200 no total)

Diluir a 1 : 1000 para a amostra do soro para a dosagem de IgA/IgG:

p. ex.: 10 µl de soro + 90 µl de tampão de amostra (1 : 10)
10 µl dos quais + 990 µl de tampão de amostra (1 : 1000 no total)

Para dosear de IgM, os soros devem ser expostos a uma absorção IgG antes do teste (p. ex. com o RIDA® RF-Absorbens, n°do art. Z 0202).

Atenção! Controle negativo e controle padrão controle de qualidade A e controle de qualidade B estão prontos para o uso e não devem ser diluídos ou absorvidos.

9.4. Primeira incubação

Depois de colocar um número suficiente de poços no suporte, 100 µl dos soros diluídos e dos controlos prontos para o uso serão pipetados nas respectivas cavidades, a posição A1 (valor do Branco reagente) fica livre. O controle negativo

Control IgA	-
-------------	---

,

Control IgG	-
-------------	---

 ou

Control IgM	-
-------------	---

 será executado simples e o controle padrão

Control IgA	+
-------------	---

,

Control IgG	+
-------------	---

 ou

Control IgM	+
-------------	---

, em duplicado. Adicionar o controle de qualidade

Control IgA	A
-------------	---

 e

Control IgA	B
-------------	---

,

Control IgG	A
-------------	---

 e

Control IgG	B
-------------	---

 ou

Control IgM	A
-------------	---

 e

Control IgM	B
-------------	---

 uma vez.. A placa será incubada a 37 °C por 30 minutos num incubador. O fundo das cavidades não deve entrar em contato com os materiais condutores de calor (papel húmido ou metal). A microplaca deve estar tapada durante a incubação.

Os controlos que correspondem às determinações (IgA, IgG ou IgM), devem ser usados.

A1	Valor vazio do reagente
B1	Controle negativo
C1	Controle padrão
D1	Controle padrão
E1	Controlo de qualidade A
F1	Controlo de qualidade B
G1, H1	Soro do paciente 1, 2, etc.

Atenção!

A microplaca não deve ser colocada em uma incubadora fria, que só se esquentará até 37 °C durante a incubação. A incubadora já deve estar na temperatura de 37 °C.

9.5. Lavagem

As cavidades devem ser esvaziadas em um contentor de dejetos com solução de hipoclorito para a desinfecção. Depois a placa é batida em papel absorvente para retirar restos de humidade. Então, lava-se 4 vezes, cada vez com 300 µl de tampão de lavagem. Com isso, deve fazer um esvaziamento completo após cada lavagem, batendo em uma parte inutilizada do papel.

Com a utilização de uma máquina automática de lavagem, deve-se observar o ajuste correto do equipamento em relação ao tipo de placa utilizado. Depois da lavagem, a placa é batida em papel absorvente para retirar restos de humidade.

9.6. Segunda incubação

Adicionar 100 µl de conjugado anti-humano IgA HD **SeroA HD**, conjugado anti-humano IgG HD **SeroG HD** ou conjugado anti-humano IgM HD **SeroM HD** nos poços correspondentes (inclusivamente A1). Em seguida incubar a placa 30 minutos a 37 °C em uma incubadora (ver ponto 9.4.).

9.7. Lavagem

Lavar 4 vezes de acordo com o ponto 9.5.

9.8. Terceira incubação

Adição de 100 µl substrato **SeroSC** em todas as cavidades. Depois a placa será incubada a 37 °C por 30 minutos num incubador. Depois, a reação é bloqueada com a adição de 100 µl de solução bloqueadora **Stop** em todas as cavidades. Após a cuidadosa mistura (batida suave na beira da placa) a absorvância é medida em um fotômetro de placa a 450 nm (comprimento de onda de referência ≥ 620 nm). A compensação do valor zero é feita com o o valor do branco reagente (posição A1).

10. Controlo de qualidade e indicações de instabilidade ou deterioração

Para o controlo de qualidade, o controlo padrão (em duplicado) e o controlo negativo devem ser feitos a cada execução de teste. O teste foi feito corretamente se o valor médio de absorvância do controlo padrão a 450/620 nm ficar dentro da faixa de valor indicada na folha de dados anexa. Se ambas as medições individuais apresentarem desvios de mais de 20% do valor médio, o teste deve ser feito novamente. O controlo negativo deve indicar um valor de absorvância de $< 0,3$ a 450/620 nm.

Os controlos de qualidade A e B do RIDASCREEN® Sero ELISA são controlos de qualidade adicionais que podem ser usados como opção.

Os valores alvo estão indicados no certificado de garantia de qualidade que está incluído no lote específico. Os valores obtidos (U/ml, UI/ml ou mUI/ml) são recomendados como valores de referência para garantia de qualidade em laboratórios acreditados.

Um desvio dos valores necessários, bem como um escurecimento de reagente ou coloração em azul do substrato antes da adição nas cavidades, pode ser uma indicação de expiração do reagente.

Se os valores prescritos não são alcançados, antes da repetição do teste deve-se controlar o seguinte:

- Validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade dos equipamentos utilizados (por ex. calibragem)
- Execução correta do teste
- Controlo visual dos componentes do kit para verificar se há contaminação ou impermeabilidade; uma solução de substrato tingida de azul não pode mais ser usada

Se, após a repetição do teste, as condições não forem alcançadas novamente, entre em contato com o distribuidor local da R-Biopharm.

11. Avaliação e interpretação

A avaliação do teste pode ser feita de três modos diferentes:

1. através da curva padrão anexa
2. através da tabela de valores (veja a folha de dados anexa)
3. matematicamente de acordo com o método dos 4 parâmetros ou o método α

O valor do Branco reagente deve ser tirado de todos os valores de absorvância antes da avaliação.

11.1. Avaliação através da curva padrão

Para efetuar uma avaliação através da curva padrão, deve ser feita uma correção da variação diária através do valor médio do controle padrão. O fator de correção F é calculado do valor prescrito do controle padrão e do valor atual medido do controle. O valor prescrito dependente é indicado na folha de dados anexa.

$$F = \frac{\text{Valor teórico do controle padrão}}{\text{Valor médio de absorvância do controle padrão}}$$

Todos os valores de DO das amostras devem ser multiplicados pelo fator F. Com os valores corrigidos, o respectivo valor U/ml na curva padrão é lido.

11.2. Avaliação através da tabela de valores

	U/ml	Área do valor do controle padrão	
			0,86 - 0,90
-	< 5,0		< 0,19
?	5,0 - 7,0		0,19 - 0,26
+	7,1 - 12,0		0,27 - 0,42
	12,1 - 25,0		0,43 - 0,75
	25,1 - 50,0		0,76 - 1,17
	50,1 - 100,0		1,18 - 1,59
	> 100,0		> 1,59

Fig. 1: Exemplo para uma determinação de IgG
(extrato de uma folha de dados específica do lote)

O valor médio de absorvância do controle padrão define na tabela de valores a coluna com a área de valor que é válida para a medição atual. Dentro da coluna o valor de absorvância medido da amostra é relacionado à área de absorvância adequada e lido na segunda coluna à esquerda do título adequado em U/ml.

O valor médio de absorvância do padrão controle em uma medição é, por exemplo, de 0,89. Neste caso, a coluna com a área de 0,86 a 0,90 da tabela é decisiva para a determinação do resultado. Uma amostra de paciente com um valor de absorvância de 0,61 fica então em uma área de título de 12,1 a 25,0 U/ml. (Os valores nominados devem ser vistos como exemplo e podem desviar dos valores atuais da folha de dados.)

A avaliação dos valores obtidos - positivo (+), negativo (-) ou duvidoso (?) – é vista na primeira coluna da tabela de valores.

11.3. Avaliação matemática

Os valores necessários para uma avaliação matemática de acordo com a avaliação do 4 parâmetros ou com o método α são indicados na folha de dados anexa.

11.4. Resultado do teste

Tab. 3: Avaliação das unidades obtidas

	IgA	IgG	IgM
negativo	< 14 U/ml	< 5 U/ml	< 20 U/ml
duvidoso	14 – 20 U/ml	5 – 7 U/ml	20 – 25 U/ml
positivo	> 20 U/ml	> 7 U/ml	> 25 U/ml

12. Limites do método

Os ensaios ELISA RIDASCREEN® Candida ELISA detectam anticorpos IgA, IgG ou IgM contra *Candida albicans* e espécies de *Candida* antigenicamente relacionadas. Uma relação entre a altura de um valor de absorvância alcançado e dos sintomas presentes ou altamente clínicos não pode ser ignorada aqui. Os resultados alcançados devem sempre ser interpretados em conjunto com o quadro clínico.

Um resultado negativo não exclui uma infecção. Nos tempos iniciais da infecção, a formação de anticorpos podem ser tão pequena que o teste resulta como negativo. Se a suspeita clínica continuar, um soro de repetição deve ser examinado depois de duas a quatro semanas.

Geralmente, para um melhor resultado diagnóstico, nos exames sorológicos dois soros consecutivos de um paciente devem ser examinados. Importante para a interpretação de um resultado é o procedimento do título.

Os anticorpos IgG contra *Candida* são encontrados em uma grande parte da população. Portanto, somente uma detecção de IgG não é suficiente para confirmar uma presença forte da doença. Importante para a interpretação de um resultado IgG é o procedimento do título.

Os anticorpos IgA indicam uma possível ocupação das mucosas com *Candida albicans*. Uma presença maior ou crescente de IgA indica uma ocupação aguda. Uma presença decrescente do título indica uma infecção passada.

Um resultado IgM positivo indica uma ocorrência aguda da doença. É possível que ocorra uma passagem de *Candida* ou de antígenos de *Candida* no sistema vascular. Uma manifestação sistêmica, entretanto, só pode ser diagnosticada em conjunto com o quadro clínico e a Anamnese.

Um resultado positivo não exclui a presença de outros agentes patogênicos como causa para uma doença.

13. Características de desempenho

Tab. 4: Variação inter-ensaio (n=30)

Variação inter-ensaio	IgA		IgG		IgM	
	OD	VK	OD	VK	OD	VK
Soro 1	0,100	n/a	0,101	n/a	0,389	n/a
Soro 2	0,576	3,9%	0,659	7,3 %	0,983	3,5%
Soro 3	1,107	5,9%	1,246	5,4%	1,372	2,4%

Tab. 5: Variação intra-ensaio (n=24)

Variação intra-ensaio	IgA		IgG		IgM	
	OD	VK	OD	VK	OD	VK
Soro 1	0,083	n/a	0,087	n/a	0,348	n/a
Soro 2	0,712	2,9%	0,614	3,0%	0,877	2,7%
Soro 3	1,029	2,5%	1,201	2,8%	1,287	2,7%

Tab. 6: Sensibilidade e especificidade em comparação com dois outros ELISAs comerciais

	IgA	IgG	IgM
Sensibilidade	100,0 %	100,0%	100.0%
Especificidade	100,0%	96,0 %	89,2 %

Tab. 7: Resultados com soros de doadores examinados de um centro de doação de sangue na Alemanha (n=212; *n=200)

212 soros de doadores	*IgA	IgG	*IgM
negativo	95,0 %	42,9%	87,0 %
duvidoso	2,5 %	2,4%	3,5 %
positivo	2,5 %	54,7%	9,5 %

Literatura

1. Araj, G.F., et al.: Diagnostic value of ELISA for detection of *Candida albicans* cytoplasmic antigens in sera of cancer patients. *J. Clin. Microbiol.* 16: 46-59 (1982)
2. Crook, W.G.: *The Yeast Connection: A Medical Breakthrough*. P.O. Box 3494, Jackson, TN 38301. Professional Books (1983)
3. Haupt, H.M., et al.: Colonization and infection with *Trichosporon* species in the immunosuppressed host. *J. Infect. Dis.* 147: 199-203 (1983)
4. Iwata, K.: A review of the literature on drunken symptoms due to yeast in the gastrointestinal tract. In "Proceedings of the Second International Specialized Symposium on Yeast." Univ. of Tokyo Press, pp. 260-268 (1972)
5. Krause, W. et al.: Fungaemia and Funguria after oral administration of *Candida albicans*. *Lancet*: 598-599 (1969)
6. Meunier-Carpenter, F., Kiehn, T.E., Armstrong, D.: Fungaemia in the immunocompromised host: Changing patterns of antigenemia high mortality. *Amer. J. Med.* 71: 363-370 (1981)
7. Palacios, H.J.: Hypersensitivity as a cause of dermatologic and vaginal moniliasis resistant to topical therapy. *Ann. Allergy* 37: 110-113 (1976)
8. Ray, T.L.: Fungal infections in the immunocompromised host. *Med. Clin. No. Amer.* 64: 955-968 (1980)
9. Robinet, R.W.: Asthma due to *Candida albicans*. *Univ. Mich. Med. Ctr. Bull.* 12-15.
10. Stone, H.H., et al.: Alimentary tract colonization by *Candida albicans*. *J. Surg. Res.* 14: 273-276 (1973)
11. Stone, H.H., et al.: *Candida* sepsis; pathogenesis and principles of treatment. *Ann. Surg.* 179: 697-711 (1974)
12. Wingard, J.R., et al.: Pathogenicity of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* after gastrointestinal inoculation in mice. *Infect. Immunol.* 29: 808-813 (1980)
13. Wingard, J.R., et al.: *Candida tropicalis*: A major pathogen in immunocompromised patients. *Ann. Int. Med.* 91: 539-543 (1979)
14. Witkins, S.S., et al.: Inhibition of *Candida albicans*: induced lymphocytes proliferation by lymphocytes and sera from woman with recurrent vaginitis. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 147: 809-811 (1983)
15. Wojdani, A., et al.: Measurement of humoral and cellular immunity for the diagnosis of Candidiasis. *Clin. Ecol.* 4: 210 (1986)