

RIDASCREEN® Leishmania IgG
Art. n° K7321



1. Uso previsto

Para utilização em diagnóstico *in vitro*. O teste RIDASCREEN® Leishmania IgG é um ensaio imunoenzimático para a determinação qualitativa de anticorpos IgG específicos contra *Leishmania infantum* em soro humano.

O teste deve ser usado para fins de confirmação em caso de suspeita de leishmaniose.

2. Sumário e explicação do teste

Após a infecção por leishmaniose, anticorpos específicos contra os patógenos são formados devido à resposta do sistema imunológico. A utilização de métodos metodológicos permite determinar a presença de anticorpos no soro. O método de teste utilizado e a escolha do antígeno específico para o patógeno desempenham um papel significativo na razoabilidade do teste.

3. Princípio do teste

O antígeno recombinado purificado de *Leishmania infantum* é revestido em uma placa de micropoços. Os anticorpos nas amostras do paciente são ligados ao antígeno e determinados durante a segunda etapa de incubação utilizando anticorpos anti-humanos (o conjugado) marcados pelas enzimas. A enzima transforma o substrato incolor (peróxido de ureia/TMB) em um produto final azul. A reação da enzima é interrompida adicionando ácido sulfúrico, e a cor da mistura muda, ao mesmo tempo, de azul para amarelo. A medição final é realizada em um fotômetro a 450 nm empregando um comprimento de onda de referência de ≥ 620 nm durante 20 minutos, após a adição do reagente bloqueador.

4. Conteúdo da embalagem

Tab. 1: Conteúdo da embalagem (existem, na embalagem, reagentes suficientes para 96 determinações)

			K7321 IgG
Plate	96 det.	Placa de micropoços, 12 tiras de micropoços (podem ser divididas) no suporte de tiras; revestido com antígenos recombinantes do <i>Leishmania infantum</i>	X
Diluent	100 ml	Tampão de amostra, solução fosfato tamponada de NaCl, pronta para uso	X
SeroWP	100 ml	Tampão de lavagem em concentrações de 10 vezes, solução tamponada de Tris/NaCl	X
Control IgG + tampa vermelha	1,2 ml	Controle positivo IgG, soro humano, pronto para uso	X
Control IgG - tampa incolor	1,2 ml	Controle negativo IgG, soro humano, pronto para uso	X
Control IgG co tampa azul	2,5 ml	Controle de limite IgG, soro humano, pronto para uso	X
Conjugate tampa laranja	12 ml	Conjugado anti-humano IgG, pronto para uso; conjugado anti-humano IgG conjugado em peroxidase em solução de proteína estabilizada	X
SeroSC	12 ml	Substrato H ₂ O ₂ /tetrametilbenzidina; pronto para uso	X
Stop	12 ml	Reagente bloqueador ácido sulfúrico 0,5 M; pronto para uso	X

Detalhes de substâncias de risco de acordo com as obrigatoriedades de marcação. Para mais detalhes: consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDS) ou informações do produto em www.r-biopharm.com.

5. Instruções de armazenamento

O kit de teste deve ser armazenado entre 2 e 8 °C e pode ser usado até a data impressa no rótulo. O tampão de lavagem diluído pode ser usado por no máximo 4 semanas quando armazenado a 2 - 8 °C, ou por 5 dias quando armazenado a temperatura ambiente (20 - 25 °C). A garantia de qualidade expirará após o término do prazo de validade.

A embalagem de alumínio contendo a placa de micropoços deve ser aberta sem danificar o fecho de vedação. As tiras de micropoços que não forem necessárias devem ser armazenadas na embalagem de alumínio. Os reagentes não devem ser contaminados e o substrato incolor precisa ser protegido contra a exposição a luz direta.

6. Materiais necessários, mas não fornecidos

6.1. Reagentes

- Água destilada ou deionizada

6.2. Acessórios

- Tubos de teste
- Misturador vórtice
- Micropipetas para 10 - 100 µl e 100 - 1000 µl de capacidade
- Cilindro de medição (1000 ml)
- Cronômetro
- Lavadora de microplacas ou pipeta multicanal
- Leitor de microplaca (450 nm, comprimento da onda de referência \geq 620 nm)
- Papel filtro (toalhas de laboratório)
- Recipiente de descarte contendo solução de hipoclorito a 0,5 %

7. Medidas preventivas

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas. O manual de instruções do procedimento de teste deve ser seguido. Não pipete amostras ou reagentes com a boca. Evite o contato com membranas mucosas ou pele com hematoma. Durante o manuseio de reagentes ou amostras, vista roupa de segurança adequada (luvas, avental de laboratório e óculos de segurança apropriados), e lave as mãos após concluir o procedimento de teste. Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras ou reagentes estiverem sendo usados.

Para obter mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDS) em www.r-biopharm.com.

Todos os reagentes e materiais usados devem ser descartados de modo adequado após o uso. Para o descarte, consulte as normas nacionais relevantes.

Os soros de controle (controle positivo, controle de limite e controle negativo) no kit foram testados quanto à presença de HIV-Ab e HCV-Ab, e também de HbsAg, trazendo resultados negativos. Apesar disto, devem ser tratados como potencialmente infecciosos, do mesmo modo que as amostras de pacientes e todos os outros materiais com que entram em contato, devendo ser tratados de acordo com as regulamentações nacionais de segurança aplicáveis.

Todos os reagentes e materiais usados devem ser descartados de modo adequado após o uso. Para o descarte, consulte as normas nacionais relevantes.

8. Coleta e armazenamento de amostra

O teste foi desenvolvido para testar amostras de soro humano. Após a coleta do sangue, para evitar hemólise, o soro deve ser separado do sangue coagulado com a maior rapidez possível. As amostras devem ser armazenadas a frio ou congeladas, até que sejam testadas. Deve-se evitar a todo custo o congelamento e descongelamento repetidos das amostras. A utilização de espécimes inativados por calor, lipêmicos, hemolíticos, icteríticos ou opacos podem levar a resultados falsos.

Tab. 2: Armazenamento de amostras

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

9. Realização do teste

9.1. Geral

Todos os reagentes e a placa de micropoços devem estar em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C) antes do uso. As tiras de micropoços não devem ser removidas da embalagem de alumínio até que tenham chegado à temperatura ambiente. Os reagentes devem ser completamente misturados imediatamente antes do uso. Após o uso, o kit deve ser armazenado imediatamente de novo entre 2 e 8 °C.

Utilize apenas o volume de reagentes que seja necessário para o procedimento de teste. Não despeje os reagentes de volta nos frascos, devido ao risco de contaminação do reagente. Não despeje os reagentes de volta nos frascos devido ao risco de contaminar o reagente.

As tiras de microtitulação não podem ser utilizadas mais de uma vez. Os reagentes e as tiras de micropoços não devem ser usados se a embalagem estiver danificada ou se os frascos estiverem vazando.

O tampão de lavagem, o tampão de amostra, o reagente bloqueador e o substrato não são específicos para o teste, e também podem ser empregados para outros RIDASCREEN® ELISA, para determinação de anticorpos contra parasitas.

9.2. Preparação do tampão de lavagem

1 parte de concentrado de tampão de lavagem [SeroWP] é misturada com 9 partes de água destilada. Para isto, coloque 100 ml do concentrado em um cilindro de medição de 1000 ml e prepare a solução completando até 1000 ml com água destilada. Todos os cristais presentes no concentrado devem ser aquecidos e dissolvidos com antecedência em banho-maria a 37 °C. O tampão diluído pode ser usado por no máximo 4 semanas, desde que seja armazenado a 2 - 8 °C, ou por 5 dias, quando armazenado a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.3. Preparação das amostras

Antes de começar o teste, dilua as amostras de soro a serem testadas com tampão de amostra **Diluent** 1:50.

Exemplo: 10 µl de soro + 490 µl de diluente

Obs.:

O controle negativo, o controle limite e o controle positivo estão prontos para usar e NÃO devem ser diluídos.

9.4. Primeira incubação

Depois de inserir um número suficiente de poços na estrutura, pipete 100 µl de soros diluídos e controles negativos **Control IgG -**, controle limite **Control IgG | co** e positivo **Control IgG +** prontos para usar em cada poço correspondente, e incube a temperatura ambiente (20 - 25 °C) por 15 minutos. Recomendamos realizar o controle de limite **Control | co** duas vezes.

9.5. Lavagem

Para a desinfecção, os poços devem ser esvaziados em um recipiente de descarte que contenha solução de hipoclorito. Depois disso, bata a placa em papel absorvente para remover a umidade residual. A seguir, lave a placa 5 vezes empregando usando 300 µl de tampão de lavagem a cada vez. Após cada lavagem, para se certificar de que os poços estão totalmente vazios, bata-os em uma parte não usada de papel absorvente.

Em caso de utilização de uma lavadora de microplacas, verifique se a máquina está ajustada corretamente para o tipo de placa a ser usada. Depois de lavar, bata a placa virada para baixo em papel absorvente, para remover todos os restos de líquido.

9.6. Segunda incubação

Adicione 100 µl de conjugado anti-humano IgG **Conjugate** em cada poço. A seguir, incube a placa por 15 minutos a temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C).

9.7. Lavagem

Lave 5 vezes conforme descrito na Seção 9.5.

9.8. Terceira incubação

Coloque 100 µl de substrato **SeroSC** em cada poço. A seguir, incube a placa por 15 minutos a temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C). Depois disso, interrompa a reação adicionando 50 µl de reagente bloqueador **Stop** a cada poço, e faça a medição por 20 minutos a 450/620 nm.

10. Controle de qualidade - indicações de instabilidade ou deterioração

Para fins de controle de qualidade, o controle negativo, o controle de limite e o controle positivo devem ser usados sempre que o teste for realizado. O controle de limite deve ser usado duas vezes e, se as duas medições individuais divergirem da média em 25 %, o teste deverá ser repetido. O teste foi realizado corretamente se a média de extinção dos controles preencher os seguintes critérios:

Tab. 3: Critérios de controles de qualidade

	OD
controle negativo	< 0,15
controle de limite	0,2 - 0,5
controle positivo	≥ índice 20

Se os valores divergirem daqueles exigidos, se o substrato estiver opaco ou ficar azul antes de ser adicionado aos poços, isto pode ser indicação de que os reagentes estão fora do prazo de validade.

Se os valores estipulados não forem obtidos, os seguintes pontos devem ser verificados antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento utilizado (por ex., calibração)
- Execução correta do teste
- Inspeção visual dos componentes do kit, à procura de contaminação ou vazamentos – uma solução de substrato que ficou azul não deve ser usada.

Se as condições ainda não tiverem sido atingidas após a repetição do teste, consulte o distribuidor local da R-Biopharm.

11. Avaliação e interpretação

11.1. Cálculo do índice da amostra

1. A absorbância média é calculada para o controle de limite.
2. O índice de amostra é obtido dividindo a absorbância da amostra pelo controle de limite.

Por exemplo: Controle de limite 1 O.D. = 0,44
Controle de limite 2 O.D. = 0,42
Amostra O.D. = 1,591

$$\text{Valor médio do controle de limite} = \frac{OD \text{ de-limite } 1 + OD \text{ de limite } 2}{2} = \frac{0,44+0,42}{2} = 0,43$$

$$\text{Índice da amostra} = \left(\frac{OD \text{ da amostra}}{OD \text{ do valor médio do controle de limite}} \right) * 10 = \left(\frac{1,591}{0,43} \right) * 10 = 37$$

11.2. Resultado do teste

Tab. 4: Avaliação do índice da amostra

	negativo	equívoco	positivo
Índice da amostra	< 9	9 - 11	> 11

12. Limitações do método

O ensaio imunoenzimático RIDASCREEN® Leishmania IgG determina anticorpos IgG específicos contra *Leishmania infantum* e deve ser realizado em caso de suspeita de leishmaniose. Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em combinação com o quadro clínico e outros achados diagnósticos.

Os indícios de anticorpos dependem da localização da parasitose e podem variar conforme o paciente.

Nos casos a seguir podem ser produzidos resultados positivos fracos e resultados equívocos:

- pessoas que foram picadas por phlebotominae (simulídeos) infectados em regiões onde a doença é endêmica e produz titulações baixas em anticorpos sem manifestação da infecção
- Pessoas que se recuperaram ou acabaram de se recuperar de infecção assintomática, de tal forma que continuam produzindo titulações baixas em anticorpos
- pessoas que sofreram essa doença no passado e continuam produzindo titulações residuais
- pessoas em estágios iniciais da doença
- fatores que não são identificáveis ou específicos

Estes casos devem ser examinados novamente testando outra amostra, levando os sintomas clínicos em consideração ou empregando outros métodos de diagnóstico. Na ausência de qualquer outro diagnóstico exato, o teste deve ser repetido com nova amostra após duas a quatro semanas.

Em caso de pessoas que sofreram casos agudos da doença ou que sofreram a doença recentemente, podem ser produzidos resultados meio e alto positivos. Titulações de anticorpos mais altas podem ser produzidas mesmo após longas infecções ocorridas no passado. Naqueles casos que não estiverem claros, o resultado deve ser interpretado em relação ao histórico de caso, sintomas clínicos e outros métodos de diagnóstico.

Os resultados negativos não descartam necessariamente a presença de leishmaniose. Durante os estágios iniciais da infecção, o número de anticorpos pode ser tão baixo que o teste gera um resultado negativo. Em caso de suspeita de leishmaniose devido ao histórico do caso, deve-se testar outra amostra de soro após quatro semanas.

Em certos casos na América do Sul, foi observada uma reação cruzada com soros contendo anticorpos contra *T. cruzi* (doença de Chagas). Este fato deve ser levado em consideração ao realizar o teste em áreas da América do Sul onde a doença de Chagas seja endêmica.

Um resultado positivo não descarta a presença de outros patógenos infecciosos.

13. Características de desempenho

Tab. 5: Variação interensaio (n = 30)

Variação interensaio	IgG	
	Índice	CV
Soro 1	44,7	5,8 %
Soro 2	15,4	9,6 %
Soro 3	13,1	8,3 %
Soro 4	0,6	n/a

Tab. 6: Variação intraensaio (n = 23)

Variação intraensaio	IgG	
	Índice	CV
Soro 1	39,1	3,0 %
Soro 2	15,7	3,6 %
Soro 3	12,3	2,0 %
Soro 4	0,2	n/a

Tab. 7: Sensibilidade e especificidade em comparação com três outros ELISAs disponíveis comercialmente

	IgG
Sensibilidade	100 %
Especificidade	100 %

Tab. 8: Resultado de teste de 200 soros de doadores de sangue em um centro de doação na Alemanha










200 soros de doadores de sangue	IgG
negativo	100 %
equívoco	0 %
positivo	0 %

14. Histórico de versões


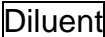
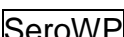
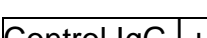
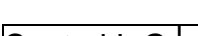

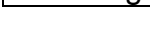
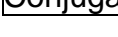

Número da versão	Capítulo e designação
15/12/2017	Versão da edição

15. Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

	Para utilização em diagnóstico in vitro
	Respeitar as instruções de utilização
	Número do lote:
	Validade
	Armazenar em
	Número do artigo
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos do teste

	Placa de microtitulação
	Tampão de amostra
	Tampão de lavagem 10x
	Controle positivo IgG
	Controle negativo IgG
	Controle de limite IgG
	Conjugado anti-humano IgG
	Substrato TMB
	Reagente bloqueador

16. Referências

1. *Bray, R.S. and Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 60, 605-609 (1966).
2. *Bray, R.S. and Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 61, 490-505 (1967).
3. *Bray, R.S.*, Ecol. Dis., 4, 257-267 (1982).
4. *Hommel, M., Peters, W., Ranque, J., Quilici, M. and Lanotte, G.*, Ann. Trop. Med. Parasitol., 72, 213-218 (1978).
5. *Kager, P.A., Rees, P.H., Welde, B.T., Hockmeyer, W.T. and Lyerly, W.H.*, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 556-559 (1981).
6. *Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 77, 569-596 (1983).
7. *Low-A-Chee, R.M., Rose, P. and Ridley, D.S.*, Ann. Trop. Med. Parasitol., 77, 255-260 (1986).
8. *Ranque, J. and Quilici, M.*, Journal of Parasitology, 56, 277-278 (1970).