

RIDASCREEN[®] Echinococcus IgG

N.º do art.: K7621



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



1. Finalidade

Para diagnóstico *in vitro*. O teste RIDASCREEN® Echinococcus IgG é um enzima-imunoensaio para a comprovação qualitativa dos anti-corpos IgG contra Echinococcus granulosus e Echinococcus multilocularis no soro humano.

O teste deve ser feito no caso de suspeita fundada de uma infecção com Echinococcus.

2. Resumo e explicação do teste

Por causa da reação do sistema imunitário, ocorre, após uma infecção com Echinococcus, 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 ondas de referência ≥ 620 nm).

4. Conteúdo da embalagem

Os reagentes de uma embalagem são suficientes para 96 doses.

Plate	96 doses	Microplaca; 12 tiras (divisíveis) no quadro de suporte; revestidas com antígenos de cisto-echinococcus
Diluent	100 ml	Tampão de amostra, solução NaCl tamponada de fosfato, pronta para o uso; de cor amarela
SeroWP	100 ml	Tampão de lavagem, 10x concentrado; solução NaCl tamponada com Tris
Control + <i>Tampa vermelha</i>	1,2 ml	Controle positivo IgG, soro humano, pronto para o uso
Control - <i>Tampa transparente</i>	2,5 ml	Controle negativo IgG, soro humano, pronto para o uso
Conjugate <i>Tampa laranja</i>	12 ml	Conjugado IgG anti-humano, pronto para o uso; anticorpos conjugados peroxidase em solução de proteína
SeroSC	12 ml	Substrato, pronto para o uso H ₂ O ₂ / tetrametilbenzidina
Stop	12 ml	Reagente bloqueador, pronto para o uso; 1 N ácido sulfúrico

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 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 5 dias 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.

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

6. Reagentes adicionais necessários – equipamento a utilizar

6.1. Reagentes

- água destilada ou deionizada

6.2. Equipamento

- Tubos de amostra
- Mixer Vortex
- Micropipetas para volumes de 10 – 100 µl e 100 – 1000 µl
- Proveta (1000 ml)
- Cronômetro
- Aparelho de lavagem para as microplacas ou pipetas de vários canais
- Fotômetro para microplacas (450 nm, filtro de referência \geq 620 nm)
- Filtro de papel (lenços de laboratório)
- Contentor para lixo com uma solução de hipocloreto 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, lipêmicas inativadas do calor pode produzir falsos resultados.

Tab. 1: 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 vasos, pois isto pode levar a uma contaminação.

As tiras microtítulo não podem ser usadas mais de uma vez. Os reagentes e as tiras microtítulo não devem ser utilizadas se a embalagem estiver danificada ou se o vaso não é impermeável. O tampão de amostra, o tampão de lavagem e o substrato/cromogênio não são específicos para o teste; eles podem também ser utilizados em outros ELISA RIDASCREEN® para a detecção de anticorpos contra parasitas.

9.2. Fabricação 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 em um cilindro de mesa 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 por 5 dias quando armazenados em temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.3. Preparação das amostras

As amostras de soro a serem examinadas serão diluídas a 1:50 antes do início do teste com o tampão de amostra **Diluent**.

por ex. 10 µl de soro + 490 µl **Diluent**

Atenção!

Controle negativo e controle positivo são prontos para o uso e não devem ser diluídos.

9.4. Primeira incubação

Depois de enfiar um número suficiente de cavidades nos quadros de suporte, 100 µl dos soros diluídos e dos controles prontos para o uso **Control -** e **Control +** serão pipetados nas respectivas cavidades e incubados a temperatura ambiente (20 – 25 °C) por 15 minutos. Recomenda-se excutar o controle negativo **Control -** em dose dupla.

9.5. Lavagem

As cavidades devem ser esvaziadas em um contentor de dejetos com solução de hipocloreto para a desinfecção. Depois a placa é batida em papel absorvente para retirar restos de humidade. Então, lava-se 5 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 com 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

Adição de 100 µl do conjugado IgG anti-humano **Conjugate** em todas as cavidades. Depois a placa é incubada por 15 minutos a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.7. Lavagem

Lavar 5 vezes de acordo com o ponto 9.5.

9.8. Terceira incubação

Adição de 100 µl do substrato **SeroSC** em todas as cavidades. Depois a placa é incubada por 15 minutos a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Depois, a reação é bloqueada com a adição de 50 µl de reagente bloqueador **Stop** em todas as cavidades. Após a cuidadosa mistura (batida suave na beira da placa) a absorbância é medida em um fotômetro de placa a 450 nm (comprimento das ondas de referência ≥ 620 nm). A compensação do valor zero é feita com o ar.

10. Controle de qualidade – Sinais da expiração do reagente

Para o controle de qualidade, o controle positivo e o controle negativo devem ser feitos a cada execução de teste (em dose dupla). O teste foi validado se o valor médio de absorbância do controlo negativo a 450 nm for menor de 0,3. Se ambas as medições individuais apresentarem desvios de mais de 25% do valor médio, o teste deve ser feito novamente. O valor de tira do controlo positivo a 450 nm deve ser maior de 0,8.

Um desvio dos valores necessários, bem como um escurecimento 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
- Controle visual dos componentes do kit para verificar se há contaminação ou impermeabilidade; uma solução de cromogênio 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 seu distribuidor R-Biopharm local.

11. Avaliação e interpretação

11.1. Cálculo do índice das amostras

1. O valor médio de extinção do controle negativo é calculado.
2. Ao valor médio de tira é adicionado 0,150. Com resultado, obtém-se o cut-off do teste.
3. Através da divisão do valor de extinção da amostra pelo cut-off, obtém-se o índice das amostras.

p. ex.: Controle negativo 1 OD = 0,115
 Controle negativo 2 O.D. = 0,125
 Amostra O.D. = 0,508

$$\text{cut-off} = \frac{0,115 + 0,125}{2} + 0,150 = 0,270$$

$$\text{Índice de amostras} = \frac{0,508}{0,270} = 1,88$$

11.2. Resultado do teste

Tab. 2: Avaliação do índice das amostras

	negativo	duvidoso	positivo
Índice das amostras	< 0,9	0,9 - 1,1	> 1,1

12. Limites dos métodos

O ensaio ELISA RIDASCREEN® Echinococcus IgG indica anticorpos IgG contra E. multilocularis e E. granulosus. Ele deve ser executado no caso de suspeita de uma equinococose. Os resultados alcançados devem ser sempre interpretados em conjunto com o quadro clínico e outros resultados diagnósticos.

Os sinais dos anticorpos dependem da localização da infestação do parasita e podem variar de paciente para paciente.

Um resultado negativo não exclui im equinococose. Nos tempos iniciais da infecção, os anticorpos podem ser tão poucos que o teste resulta como negativo ou duvidoso. Se houver de forma anamnésica a suspeita fundada de uma equinococose, uma outra amostra de soro deve ser examinada após o período de 2 a 4 semanas.

Reações cruzadas são descritas com anticorpos contra Taenia solium.

Um resultado positivo não exclui a presença de outros agentes patogênicos infecciosos.

13. Características de desempenho

Tab. 3: Variação-inter-ensaio (n=30)

<u>Varição-inter-ensaio</u>	<u>IgG</u>	
	índice	VK
Serum 1	3,25	15,5 %
Serum 2	1,35	19,0 %
Serum 3	1,81	7,4 %
Serum 4	0,22	n/a

Tab. 4: Variação-intra-ensaio (n=23)

<u>Variação-intra-ensaio</u>	<u>IgG</u>	
	índice	VK
Serum 1	2,51	8,0 %
Serum 2	1,47	4,8 %
Serum 3	1,16	9,7 %
Serum 4	0,14	n/a

Tab. 5: Sensibilidade e especificidade em comparação com uma outra ELISA comerciais

	IgG
Sensibilidade	93,8 %
Especificidade	90,6 %

Tab. 6: Resultados com 200 soros de doadores examinados de um centro de doação desangue na Alemanha

	negativo	duvidoso	positivo
200 soros de doadores	100%	0%	0%

Literatura

1. Ash, L. and Orihel, T., *Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification*, ASCP Press, pg. 176-177 (1987).
2. Coltorti, E., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35 (5), 1000-1005 (1986).
3. Coltorti, E. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 38 (3), 603-607 (1988).
4. Kagan, I., *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 3rd Edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C., pg. 472 (1986).
5. Krogstad, D., Visvesvara, G., Walls, R. and Smith, J., *Manual of Clinical Microbiology*, 4th Edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C., pg. 657-659 (1985).
6. Schantz, P.M. and Gottstein, B., *Immunodiagnosis of Parasitic Diseases, Vol. 1, Helminths Diseases*, Academic Press, pg. 69-107 (1986).
7. Schantz, P.M. et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29, 609-612 (1980).