

VIROTECH Enterovirus IgG ELISA
(Enterovirus IgG ELISA)

N.º de encomenda: EC116G00

VIROTECH Enterovirus IgM ELISA
(Enterovirus IgM ELISA)

N.º de encomenda: EC116M00

VIROTECH Enterovirus IgA ELISA
(Enterovirus IgA ELISA)

N.º de encomenda: EC116A00

Código de cor: IgG: castanho/ marrom escuro
IgM: tira de teste castanho
IgM: tira de referência castanho/transparente
IgA: incolor

EXCLUSIVAMENTE PARA O DIAGNÓSTICO IN VITRO



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Alemanha

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Índice

1. Utilização	3
2. Princípio do teste.....	3
3. Conteúdo da embalagem	3
3.1 Kit de teste IgG.....	3
3.2 Kit de teste IgA	3
3.3 Kit de teste IgM.....	3
4. Conservação e prazo de validade do kit de teste e dos reagentes prontos a usar.....	4
5. Medidas de precaução e avisos	4
6. Material necessário mas não fornecido.....	4
7. Realização do teste.....	4
7.1 Material de análise	5
7.2 Preparação dos reagentes	5
7.3 Realização do teste Virotech ELISA.....	5
7.4 Utilização de processadores ELISA	6
8. Avaliação do teste	6
8.1 Controlo de função do teste (IgG e IgA).....	6
8.2 Controlo de função do teste (IgM).....	6
8.3 Cálculo das unidades Virotech (VE)) (IgG e IgA)	7
8.4 Cálculo das unidades Virotech (VE) (IgM)	7
8.5 Avaliação dos resultados.....	7
8.6 Limitações do teste.....	7
9. Literatura	8
10. Esquema de realização do teste.....	9

1. Utilização

O ELISA destina-se à comprovação de anticorpos IgG, IgA e IgM específico de grupo contra o enterovírus no soro humano.

2. Princípio do teste

O anticorpo (IgG, IgA) procurado no soro humano forma juntamente com o antígeno fixado na microplaca um imunocomplexo. As imunoglobulinas não ligadas são removidas por processos de lavagem. O conjugado enzimático liga-se a este complexo. Os imunoglobulinas não ligados são novamente removidos por processos de lavagem. Após a adição do substrato (TMB) é criado pela actividade enzimática (peroxidase) um corante azul que após a adição da solução de stop muda para amarelo.

3. Conteúdo da embalagem

3.1 Kit de teste IgG

1. **1 microplaca**, constituída por 96 poços individuais, separáveis, revestidos com antígeno, liofilizado
2. **Tampão de diluição PBS (azul, pronto a usar), 2x50ml**, pH 7,2, com conservantes e Tween 20
3. **Solução de lavagem PBS (20x concentrada), 50 ml**, pH 7,2, com conservantes e Tween 20
4. **Controlo negativo de IgG, 2000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
5. **Controlo cut-off de IgG, 2000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
6. **Controlo positivo de IgG, 2000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
7. **Conjugado IgG (anti-humano), 11 ml**, conjugado peroxidase de rábano (ovelha ou cabra) com estabilizadores proteicos e conservantes em tampão Tris, pronto a usar
8. **Solução substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), 11ml**, pronto a usar
9. **Solução stop citrato, 6ml**, contém uma mistura de ácidos

3.2 Kit de teste IgA

1. **1 microplaca**, constituída por 96 poços individuais, separáveis, revestidos com antígeno, liofilizado
2. **Tampão de diluição PBS (azul, pronto a usar), 2x50ml**, pH 7,2, com conservantes e Tween 20
3. **Solução de lavagem PBS (20x concentrada), 50 ml**, pH 7,2, com conservantes e Tween 20
4. **Controlo negativo de IgA, 2000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
5. **Controlo cut-off de IgA, 2000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
6. **Controlo positivo de IgA, 2000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
7. **Conjugado IgA (anti-humano), 11 ml**, conjugado peroxidase de rábano (ovelha ou cabra) com FCS e conservantes em tampão Tris, pronto a usar
8. **Solução substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), 11ml**, pronto a usar
9. **Solução stop citrato, 6ml**, contém uma mistura de ácidos

3.3 Kit de teste IgM

Box 1

1. **1 microplaca (tira de teste)**, constituída por 96 poços individuais, separáveis, revestidos com antígeno, liofilizado
2. **Tampão de diluição PBS (azul, pronto a usar), 3x50ml**, pH 7,2, com conservantes e Tween 20
3. **Solução substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), 2x11ml**, pronto a usar

Box 2

1. **1 microplaca (tira de referência)**, constituída por 96 poços individuais, separáveis, revestidos, liofilizado
2. **Solução de lavagem PBS (20x concentrada), 2x50 ml**, pH 7,2, com conservantes e Tween 20
3. **Controlo negativo de IgM, 4000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
4. **Controlo cut-off de IgM, 4000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
5. **Controlo positivo de IgM, 4000µl**, soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar
6. **Conjugado IgM (anti-humano), 2x11 ml**, conjugado peroxidase de rábano (ovelha ou cabra) com FCS e conservantes em tampão Tris, pronto a usar
7. **Solução stop citrato, 2x6ml**, contém uma mistura de ácidos

4. Conservação e prazo de validade do kit de teste e dos reagentes prontos a usar

Conservar o kit de teste a uma temperatura de 2-8°C. O prazo de validade dos vários componentes é indicado na respectiva etiqueta, o prazo de validade do kit consta no certificado de controlo de qualidade.

1. Depois de retirar os poços individuais necessários, conservar os poços/tiras restantes no saco fechado juntamente com o dissecador a uma temperatura de 2-8°C. Depois de terem sido usados conservar os reagentes de imediato novamente a 2-8°C.
2. O conjugado pronto a usar e o substrato TMB são sensíveis à luz e devem ser guardados num lugar escuro. Se devido à incidência de luz se verificar uma coloração do substrato, este deve ser inutilizado.
3. Retirar apenas a quantidade de conjugado pronto a usar ou de TMB necessária para a realização do teste. Uma eventual demasia de conjugado ou TMB deve ser inutilizada, não pode ser novamente guardada.

Material	Estado	Armazenamento	Durabilidade
Amostras	Diluído	+2 a +8°C	máx. 6h
	Não diluído	+2 a +8°C	1 semana
Controlos	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
Placa de microtitulação	Depois de abrir	+2 a +8° (armazenamento dentro do saco fornecido com saco contendo dissecante)	3 meses
Absorvente de factor reumatóide	Não diluído, Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
	Diluído	+2 a +8°C	1 semana
Conjugado	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
Tetrametilbenzidina (TMB)	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
Solução stop	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
Solução de lavagem	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
	Estado diluído final (pronto a usar)	+2 a +25°C	4 semanas

5. Medidas de precaução e avisos

1. Como soros de controlo são usados apenas soros que foram testados e que se revelaram negativos em relação aos anticorpos de HIV1, HIV2, HIV3 e ao antígeno de superfície de hepatite B. Mesmo assim, todas as amostras, amostras diluídas, controlos, conjugados e as microtiras devem ser considerados como material potencialmente infeccioso e manuseados com o respectivo cuidado necessário. São aplicáveis as directivas para trabalhos em laboratório.
2. Os componentes que contêm conservantes bem como a solução stop de citrato e a TMB têm um efeito irritante sobre a pele, os olhos e as mucosas. Em caso de contacto lavar as áreas afectadas do corpo imediatamente com água corrente e consultar, eventualmente, um médico.
3. A eliminação ecológica dos materiais usados deve ser realizada de acordo com as directivas do respectivo país.

6. Material necessário mas não fornecido

1. Água destilada/desmineralizada
2. Pipeta multi-canal 50µl, 100µl
3. Micropipetas: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Tubos de ensaio
5. Panos de celulose
6. Cobertura para as placas ELISA
7. Recipiente para os resíduos de material infeccioso
8. Lavador manual ELISA ou lavador automático para microplacas
9. Fotómetro espectral para microplacas com filtro de 450/620nm (comprimento de onda de referência 620-690nm)
10. Incubadora

7. Realização do teste

O cumprimento exacto das normas de trabalho é o pré-requisito para obter resultados corretos.

7.1 Material de análise

Como material de análise podem ser usados soro e plasma (o tipo de anticoagulantes não é relevante), mesmo se neste folheto se refere apenas o soro.

As diluições para doentes devem ser preparadas sempre frescas.

Para conservar os soros durante mais tempo, estes devem ser congelados. Evitar descongelá-los várias vezes.

1. Usar apenas soros frescos não inativados.
2. Não use amostras hiperlipémicas, hemolíticas e microbianamente contaminadas nem soros turvos (resultados positivos/negativos errados).

7.2 Preparação dos reagentes

A **VIROTECH** System Diagnostik oferece uma grande flexibilidade através da possibilidade da aplicação inter-parâmetros e inter-lotes de tampões de diluição e de lavagem, TMB, solução de paragem de citrato, assim como do conjugado. Os controlos prontos a utilizar (controlos positivos, controlos de *cut-off*, controlos negativos) são específicos do parâmetro e devem ser utilizados exclusivamente com o lote de placas indicado no certificado de controlo de qualidade.

1. Regular a incubadora para 37°C e antes do início da incubação verificar se a temperatura é atingida.
2. Todos os reagentes devem atingir a temperatura ambiente antes de serem abertos.
3. Agitar bem todos os componentes líquidos antes da sua utilização.
4. Misturar o concentrado de solução de lavagem com água dest./desmin. até se obter 1 litro de solução (se o concentrado formar cristais, aquecer à temperatura ambiente antes de diluir e agitar bem antes de utilizar).
5. Elevadas titulações de IgG ou factores reumatóides podem perturbar a detecção específica de anticorpos IgM e dar origem a resultados positivos ou negativos errados. **Pré-tratar os soros com RF-SorboTech** (meio de adsorção VIROTECH). Nos controlos de IgM a adsorção prévia não é necessária.

7.3 Realização do teste VIROTECH ELISA

Todas as amostras destinadas ao teste são testadas ao **IgM** tanto com a **tira de teste** (tira de antígeno do enterovírus) como também com a **tira de referência** (tira de antígeno de controlo). Antes de iniciar o teste, as tiras de teste e as tiras de referência necessárias, em número correspondente ao número de amostras existentes, são colocadas lado a lado num suporte. **Só podem ser combinadas tiras de teste e tiras de referência com os números de lote indicados no certificado de controlo de qualidade.**

Os testes ao IgA ou IgG são realizados com apenas uma microplaca.

1. Por cada teste pipetar 100µl do tampão de diluição pronto a usar (valor zero), do controlo negativo, controlo cut-off, controlo positivo de IgG, IgM e IgA e dos soros de paciente diluídos. Recomendamos usar sempre duas soluções (valor zero, controlos e soros de paciente); no controlo cut-off duas soluções são absolutamente necessárias. Diluição de trabalho dos soros de paciente: 1+100; p.ex. 10µl de soro + 1ml de tampão de diluição.
2. Depois da pipetagem realiza-se a incubação durante 30 min. a 37°C (com cobertura).
3. Findo o período de incubação, lavar 4x os poços, cada uma com 350-400µl de solução de lavagem por poço. Não deixar a solução de lavagem dentro dos poços, removendo os últimos restos de líquido batendo sobre uma base de celulose.
4. Pipetar 100µl do conjugado pronto a usar em todos os poços.
5. Incubar os conjugados 30 min. a 37°C (com cobertura)
6. Termine a incubação do conjugado com 4 lavagens (ver Ponto 3).
7. Pipetar 100µl do substrato TMB pronto a usar em todos os poços.
8. Incubação da solução de substrato: 30 minutos a 37°C (tapar e colocar num lugar escuro).
9. Parar a reacção do substrato, pipetando 50µl de solução stop de citrato em todos os poços. Agitar a placa cuidadosamente até os líquidos estarem totalmente misturados e ser visível uma cor amarela homogénea.
10. Medir os coeficientes de extinção com 450/620nm (comprimento de onda de referência 620-690nm). Regular o fotómetro por forma a que o valor zero medido seja subtraído de todas as outros coeficientes de extinção. A medição fotométrica deve ser realizada no prazo de uma hora após a adição da solução stop.

Esquema de realização do teste ver última página

7.4 Utilização de processadores ELISA

Todas as ELISAs da [VIROTECH](#) podem ser executadas com a ajuda de processadores ELISA. O utilizador deve realizar uma validação regular dos aparelhos.

[Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH](#) recomenda proceder da forma seguinte:

1. Para o ajuste do aparelho ou a realização de reparações de maior envergadura do seu processador ELISA, [Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH](#) recomenda a validação do aparelho de acordo com as indicações do fabricante do aparelho.
2. Recomenda-se verificar o processador ELISA, a seguir, com a ajuda do kit de validação (EC250.00). Esta verificação regular com o kit de validação deve ser realizada pelo menos uma vez por trimestre.
3. Sempre que se realize o teste, devem ser preenchidos os critérios de conformidade do certificado de controlo de qualidade do produto.

Este procedimento garante um funcionamento perfeito do seu processador ELISA e destina-se à garantia de qualidade do laboratório.

8. Avaliação do teste

Os controlos prontos a usar destinam-se a uma determinação semiquantitativa de anticorpos IgG e IgM específicos cuja concentração é indicada em unidades VIROTECH (=VE). Oscilações devidas ao modo de realização do teste são compensadas pelo método de cálculo, sendo conseguida uma elevada reproduzibilidade. Para o cálculo das unidades VIROTECH são utilizados os valores médios dos valores OD.

8.1 Controlo de função do teste (IgG e IgA)

a) Valores de OD

O valor OD do valor vazio deve ser $<0,15$.

Os valores de OD dos controlos negativos devem situar-se abaixo dos valores de OD indicados no certificado de controlo de qualidade, enquanto os valores de OD dos controlos positivos e dos controlos cut-off devem situar-se acima dos valores de OD indicados no certificado de controlo de qualidade.

b) Unidades VIROTECH (VE)

As unidades VIROTECH (VE) dos controlos cut-off são definidas com 10 VE. As VE calculadas dos controlos positivos devem situar-se dentro das gamas indicadas no certificado de controlo de qualidade.

Se os requisitos (valores de OD, VE) não forem preenchidos, o teste deve ser repetido.

8.2 Controlo de função do teste (IgM)

1. De todos os valores de extinção dos controlos positivos, cut-off e negativos e dos soros de paciente nas tiras de teste são subtraídos os valores vazios (=“**valores de teste**”).
1. De todos os valores de extinção dos controlos positivos, cut-off e negativos e dos soros de paciente nas tiras de referência são subtraídos os valores vazios (=“**valores de referência**”).
1. Para todos os controlos positivos, cut off e negativos e para os soros de paciente são calculadas as “**Diferenças valores de teste menos valores de referência**”, na medida em que dos respectivos valores de teste são subtraídos os valores de referência correspondentes.

a) Valores de OD

A diferença valor de teste – valor de referência dos controlos negativos deve situar-se abaixo dos valores de OD indicados no certificado de controlo de qualidade, enquanto a diferença valor de teste – valor de referência dos controlos positivos e dos controlos cut-off devem situar-se acima dos valores de OD indicados no certificado de controlo de qualidade.

b) Unidades VIROTECH (VE)

As unidades VIROTECH (VE) dos controlos cut-off são definidas com 10 VE. As VE calculadas dos controlos positivos devem situar-se dentro das gamas indicadas no certificado de controlo de qualidade.

Se os requisitos (valores de OD, VE) não forem preenchidos, o teste deve ser repetido.

8.3 Cálculo das unidades VIROTECH (VE) (IgG e IgA)

A extinção do valor zero (450/620nm) deve ser subtraída de todas os coeficientes de extinção.

$$\begin{aligned} \text{VE}_{(\text{controle positivo})} &= \frac{\text{OD}_{(\text{controle positivo})}}{\text{OD}_{(\text{controle cut-off})}} \times 10 \\ \text{VE}_{(\text{soro de paciente})} &= \frac{\text{OD}_{(\text{soro de paciente})}}{\text{OD}_{(\text{controle cut-off})}} \times 10 \end{aligned}$$

8.4 Cálculo das unidades VIROTECH (VE) (IgM)

A extinção do valor vazio (450/620nm) deve ser subtraída de todas as extinções.

$$\begin{aligned} \text{VE}_{(\text{controle positivo})} &= \frac{\text{diferença (valor de teste - valor de referência do controle positivo)}}{\text{diferença (valor de teste - valor de referência do controle cut-off)}} \times 10 \\ \text{VE}_{(\text{soro de paciente})} &= \frac{\text{diferença (valor de teste - valor de referência do soro de paciente)}}{\text{diferença (valor de teste - valor de referência do controle cut-off)}} \times 10 \end{aligned}$$

Exemplo

- OD na tira de teste do controle positivo: 0,853
- OD na tira de referência do controle positivo: 0,107
- Diferença valor de teste – valor de referência do controle positivo: 0,746
- OD na tira de teste do controle cut-off: 0,341
- OD na tira de referência do controle cut-off: 0,073
- Diferença valor de teste – valor de referência do controle cut-off: 0,268

$$\text{VE}_{(\text{controle positivo})} = \frac{0,746}{0,268} \times 10 = 27,8$$

8.5 Avaliação dos resultados

Resultado (VE)	Avaliação
< 9,0	negativo
9,0 - 11,0	no limite
> 11,0	positivo

1. Se as VE medidas na amostra se situarem acima da área limite, as amostras são consideradas positivas.
2. Se as VE medidas se encontrarem dentro da área limite indicada, não se verifica uma concentração de anticorpos que pudesse ser considerada significativa; as amostras são consideradas no limite. Para uma detecção segura de uma infecção é necessário determinar o teor de anticorpos de duas amostras do soro. Uma amostra do soro deve ser testada imediatamente após o início da infecção e uma segunda amostra 5-10 dias mais tarde (soro reconvalescente). A concentração de anticorpos das duas amostras deve ser determinada em paralelo, isto é, na mesma solução base. Um diagnóstico correcto baseado na avaliação de uma única amostra de soro não é possível.
3. Se os valores medidos se situarem abaixo da área limite definida, não existem anticorpos específicos para o antígeno que fossem medíveis na amostra. As amostras são consideradas negativas.

8.6 Limitações do teste

A resposta imunológica pode ser homotipo ou heterotipo. Os anticorpos homotipos dirigem-se contra epitopos serotipo específicos, enquanto os anticorpos heterotipos reconhecem os epitopos que entre os serotipos são idênticos ou semelhantes.

O ELISA da VIROTECH identifica anticorpos heterotípicos com reacção cruzada contra o enterovírus, com a ajuda de preparações de antígenos desnaturados pelo calor. Para o diagnóstico em relação a uma infecção com o enterovírus é necessário ter em consideração o seguinte:

1. A presença de epitopos com reactividade cruzada perante o enterovírus inactivado pelo calor pode apresentar diferenças quantitativas e qualitativas, conforme os serotipos e os isolantes usados para a preparação do antígeno. Assim, também pode variar o espectro de anticorpos heterotípicos que é detectado com sistemas de teste diferentes.
2. A relação quantitativa entre anticorpos homotípicos e anticorpos heterotípicos no soro de paciente pode variar. Os estudos de King et al. (6) indicam que durante a primeira infecção com o enterovírus na idade de infância são formados, em primeiro lugar, anticorpos homotípicos e só com o avançar da idade e do número de infecções com o enterovírus então já sofridas, aumenta a percentagem de anticorpos heterotípicos. Assim, no ELISA da VIROTECH para o enterovírus podem surgir resultados negativos naqueles casos em que a resposta imunológica heterotípica é fraca quando comparada com a resposta homotípica.
3. Uma vez que o ELISA também detecta soros polio-positivos, não é possível excluir que a existência de uma titulação de soro imunizante possa provocar um resultado positivo.
4. Foram descritas reacções cruzadas entre o enterovírus e a hepatite A, o vírus Epstein-Barr (EBV), o vírus da citomegalia (CMV) e o rinovírus (7).
5. A interpretação dos resultados sorológicos deve incluir sempre o quadro clínico, dados epidemiológicos e outros resultados analíticos eventualmente disponíveis.

9. Literatura

1. Diagnostische Bibliothek: Coxsackie- und Echoviren; In vitro Diagnostica Nachrichten; 24 (1994) 1-8.
2. MIQ 13; Infektionen des Mundes und der oberen Atemwege; 35-37 (2000).
3. RKI, Übersicht zu Erkrankungen durch Enteroviren, Stand: Mai 2002.
4. Bomann J et al., Serum IgA, IgG und IgM Responses to different Enteroviruses as measured by a Coxsackie B5-based indirect ELISA; J. Med.Virol.; 38:32-35 (1992).
5. Swanink CMA et al., Coxsackie B1-Based Antibody-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA with Broad Specificity for Enteroviruses, J. Clin. Microbiol. 31:3240-3246 (1993)
6. King M.J., Bidvell D., Shaikh A, Voller A., Banatvala J.E. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; type 1) diabetes mellitus, Lancet i: 1397-9 (1983)
7. Samuelson, A. et al., Aspects on the serodiagnosis of enterovirus infections by ELISA, Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.; 4:395-406 (1990).

Preparação das amostras de pacientes e solução de lavagem

▼ **Solução de lavagem:** Juntar água destilada/desmineralizada ao concentrado, por forma a obter 1 litro.

▼ **Diluição amostras IgG/IgA**
1:101

p.ex.:

10 µl de soro/plasma + 1000 µl de tampão de diluição
(o tampão de diluição do soro está pronto a usar)

▼ **Diluição amostras IgM**
1:101

Adsorção de factores reumatóides com RF-SorboTech

p.ex.:

5 µl de soro/plasma + 450 µl de tampão de diluição +
1 gota de RF-SorboTech incubar durante 15 min. à
temperatura ambiente

Realização do teste

