

**VIROTECH Tetanus IgG ELISA
(Tetanus IgG ELISA)**

Nº de encomenda: EC124.00

Código de cor: branco/transparente

EXCLUSIVAMENTE PARA O DIAGNÓSTICO IN VITRO

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Índice

1. Utilização	3
2. Princípio do teste	3
3. Conteúdo da embalagem (kit de teste IgG)	3
4. Conservação e prazo de validade do kit de teste e dos reagentes prontos a usar	3
5. Medidas de precaução e avisos	4
6. Material necessário mas não fornecido	4
7. Realização do teste	4
7.1 Material de análise	4
7.2 Preparação dos reagentes	4
7.3 Realização do teste VIROTECH ELISA	4
7.4 Utilização de processadores ELISA	5
8. Avaliação do teste	5
8.1 Controlo de função do teste	5
8.2 Avaliação	5
8.3 Interpretação	6
8.4 Limitações do teste	7
9. Avaliação de teste IgG com o método de 4 parâmetros	7
9.1 Controlo da função de teste	7
9.2 Conversão dos resultados quantitativos em unidades internacionais por milímetro (IU/ml)	7
10. Literatura	8
11. Esquema de realização do teste	9

1. Utilização

O ELISA Tétano destina-se à comprovação quantitativa de anticorpos IgG contra a toxóide do tétano, a fim de verificar o sucesso da vacina e de definir a situação imunológica.

2. Princípio do teste

O anticorpo 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 (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. **Soros IgG Ak tipo padrão** para a curva padrão, 6 frascos com 2ml cada, prontos a usar, soro humano com conservantes; 0,001IU/ml, 0,002IU/ml, 0,005IU/ml, 0,01IU/ml, 0,02IU/ml, 0,05IU/ml (IU = international units, unidades internacionais).
5. **Controlo IgG altamente positivo, 2 ml**, soro humano com conservantes, pronto a usar
6. **Controlo IgG fracamente positivo, 2 ml**, soro humano com 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

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
Tetrametilbenzidina (TMB)	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
Absorvente de factor reumatóide	Depois de abrir	+2 a +8°C (protegido contra a luz)	3 meses
Solução stop	Depois de abrir	+2 a +8°C	3 meses
	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 padrão e 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, soros padrão, 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 da VIROTECH Diagnostics 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 amostras dos pacientes podem ser guardadas durante 1 semana a 2–8 °C.

As diluições para doentes devem ser preparadas sempre frescas. Validade máxima 6 h a 2-8°C.

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

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

7.2 Preparação dos reagentes

A VIROTECH Diagnostics 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 soros padrão bem como os controlos alta e fracamente positivos destinam-se exclusivamente ao kit de teste utilizado. Por isso, não usar em outros lotes.

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).

7.3 Realização do teste VIROTECH ELISA

1. Por cada teste pipetar 100µl do tampão de diluição pronto a usar (valor vazio), dos soros padrão e de controlo prontos a usar bem como dos soros de paciente diluídos. Recomendamos usar sempre duas soluções (valor vazio, soros padrão, controlos e soros de paciente). Utilizado como controlo de calibração do padrão 0,01 UI/ml para a avaliação do teste

mediante o método de 4 parâmetros, sendo obrigatoriamente necessária uma dupla preparação. Diluição de trabalho dos soros dos pacientes: 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 homogênea.
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 Diagnostics podem ser executadas com a ajuda de processadores ELISA. O utilizador deve realizar uma validação regular dos aparelhos.

VIROTECH Diagnostics recomenda proceder da forma seguinte:

1. Para o ajuste do aparelho ou a realização de reparações de maior envergadura do seu processador ELISA, VIROTECH Diagnostics 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

8.1 Controlo de função do teste

- a) Valores de OD

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

Os valores da DO do padrão mais baixo (0,001 UI/ml) devem situar-se acima dos valores de DO indicados no certificado de controlo de qualidade e os valores de DO do padrão mais alto (0,050 UI/ml) devem situar-se abaixo dos valores de DO indicados no certificado de controlo de qualidade.

- b) A concentração determinada dos controlos alta e fracamente positivos deve situar-se dentro da área de referência indicada no certificado de controlo de qualidade (IU/ml).
- c) O teste deve ser repetido se os requisitos (DO / IU/ml) não forem preenchidos.

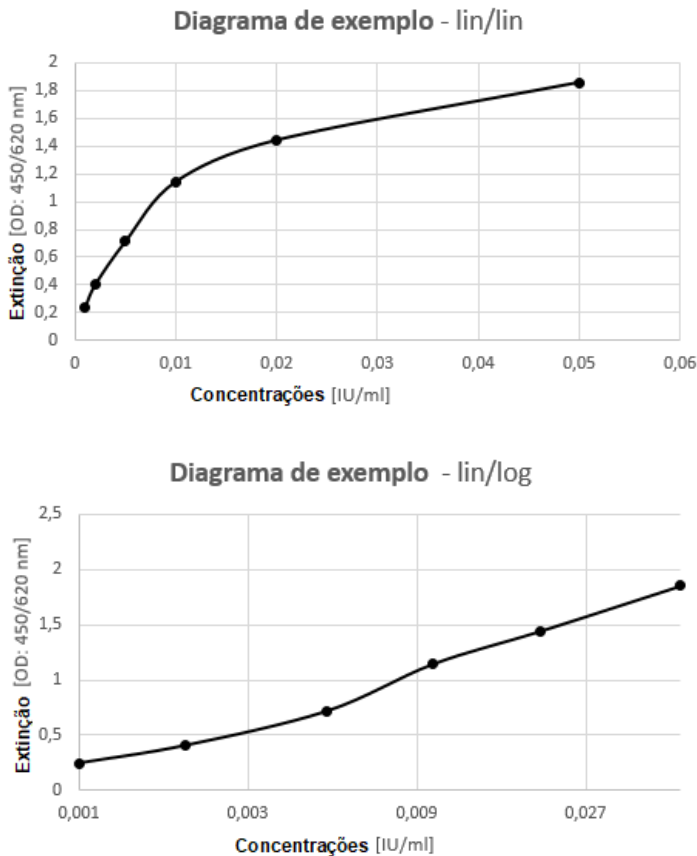
8.2 Avaliação

Com a ajuda dos padrões é criada no papel milimétrico semilogarítmico uma curva padrão que permita calcular o teor de anticorpos IgG antitoxóidos do tétano no soro. Os valores médios das extinções dos dois soros padrão são inseridos na ordenada (eixo y) e as concentrações (IU/ml dos padrões prontos a usar) na abcissa (eixo X). É preciso ter em atenção que os soros de paciente foram diluídos 1:100 para a realização do teste. Por isso, o resultado lido no diagrama deve ser multiplicado com 100. Para a criação da curva padrão pode ser feita a escolha entre o cálculo de ponto-a-ponto e o cálculo baseado em 4 parâmetros.

A ter em atenção:

As amostras cujas concentrações IU/ml determinadas se situam abaixo de 0,1IU/ml podem ser usadas num novo teste com uma diluição de 1:10. A diluição divergente deve ser tida em consideração na avaliação.

As amostras cujos valores de extinção são superiores ao do padrão 0,05IU/ml devem ser utilizadas no teste com uma diluição maior, por exemplo 1:200, 1:400 etc. Nos valores de DO acima de 2,00 a precisão de medida diminui conforme aumenta a densidade ótica. Por isso recomenda-se que os soros que com uma diluição de 1:100 obtêm valores de DO acima de 2,00 sejam usados no teste com uma diluição maior, por exemplo, 1:200, 1:400 etc. As diluições divergentes destas devem ser tidas em consideração na avaliação.



8.3 Interpretação

As concentrações da antitoxóido do tétano são expressas em unidades internacionais (IU/ml), tendo por base as padrões da OMS. Um teor de anticorpos IgG antitoxóidos do tétano >0,1IU/ml é indicado como protecção imunológica (2, 11) ou protecção imunológica segura (9, 10). As vacinações de reforço não são indicadas em concentrações de anticorpos acima de 0,5 IU/ml (10). A seguir gostaríamos de chamar a atenção para as seguintes recomendações de vacinação. Estas foram elaboradas com base nas recomendações do Grupo de Trabalho Imunoprofilaxia (13):

IU/ml	Interpretação e procedimento seguinte
< 0,01	- sem protecção vacinal - conforme a anamnese é necessária vacinação primária ou dose de reforço - controlo serológico após 4 a 8 semanas
0,01 – 0,1	- protecção vacinal não garantida - necessária dose de reforço - controlo serológico após 4 a 8 semanas

0,11 – 0,5	- proteção vacinal ainda existente a curto prazo - dose de reforço recomendada - dose de reforço proporciona proteção vacinal a longo prazo
0,51 – 1,0	- proteção vacinal existente - dose de reforço ou controlo serológico recomendado após 3 anos - Nota: uma vacinação com concentrações de anticorpos > 0,5 IU/ml pode provocar reações não desejadas
> 1,0 – 5,0	- proteção vacinal existente a longo prazo - dose de reforço ou controlo serológico recomendado após 5 anos, não antes
> 5,0 – 10,0	- proteção vacinal existente a longo prazo - dose de reforço ou controlo serológico recomendado após 8 anos, não antes
> 10	- proteção vacinal existente a longo prazo - dose de reforço ou controlo serológico recomendado após 10 anos, não antes

8.4 Limitações do teste

1. A interpretação dos resultados sorológicos deve incluir sempre o quadro clínico, dados epidemiológicos e outros resultados analíticos eventualmente disponíveis.
2. O ELISA Tétano VIROTECH não é adequado para o diagnóstico laboratorial de uma infecção.
3. Para a interpretação da titulação da antitoxóide deve ser considerado também o boletim de vacinas ou a indicação da última vacina contra o tétano.
4. Uma interpretação de titulações de antitoxóides inferiores a 0,1 IU/ml não é recomendável, uma vez que se situam abaixo do limite de sensibilidade tecnicamente reproduzível na utilização de um sistema de teste ELISA. Por isso, deverá ser considerada a anamnese individual da vacinação, a fim de decidir se há necessidade de proceder a uma imunização básica ou a uma vacina de reforço.

9. Avaliação de teste IgG com o método de 4 parâmetros

Há a possibilidade de efectuar uma análise quantitativa com o VIROTECH Tetanus IgG ELISA através do método de 4 parâmetros. Como controlo de calibração é utilizado o padrão 0,01 IU/ml. O controlo de calibração compensa as variações causadas pela execução do teste. O cálculo realiza-se com base nos resultados médios dos valores OD.

9.1 Controlo da função de teste

a) Valores OD

O valor OD do valor em branco deve ser <0,15.

O valor OD do controlo de calibração deve situar-se dentro dos limites indicados no certificado de controlo da qualidade.

b) IU/ml

As concentrações de IgG anti-tetanus (IU/ml) do controlo ligeiramente positivo e do controlo fortemente positivo devem situar-se dentro dos limites indicados.

Não sendo cumpridos os requisitos (valores OD, IU/ml), deve repetir-se o teste.

9.2 Conversão dos resultados quantitativos em unidades internacionais por milímetro (IU/ml)

A absorvância do valor em vazio (450/620nm) deve ser deduzido de todas as absorvâncias.

A quantificação dos soros de doentes faz-se através da conversão em unidades internacionais. A curva padrão é determinada por regressão não linear mediante análises abrangentes, sendo, em seguida, descrita através da seguinte fórmula matemática (12):

$$IU/ml = \exp(-(\ln((D-A)/((OD \text{ korr})-A)-1)-B)/C)$$

Representando

A:	o valor OD esperado numa concentração de IgG anti-tetanus de 0
B:	o factor de subida
C:	o ponto de viragem
D:	o valor OD esperado com uma concentração de IgG anti-tetanus infinitivamente alta
OD korr:	o valor OD corrigido do soro do doente

Para se tomar em consideração as variações durante o procedimento do teste, o valor OD medido no soro do doente é corrigido com base num controlo de calibração:

$$\text{OD korr} = \text{OD soro do doente} * \frac{\text{OD pré - definido controlo de calibração}}{\text{OD medido controlo de calibração}}$$

Os valores relativos aos parâmetros A, B, C e D, bem como o valor pré-definido para o OD do controlo de calibração constam do certificado.

Para um software de avaliação não compatível com este método de cálculo encontram-se definidos, no certificado, 6 pares de valores adicionais, os quais descrevem igualmente a curva padrão.

A área quantificável situa-se entre 0,01 IU/ml e 15 IU/ml.

Determinação da IU/ml

Para determinação da IU/ml está disponível um software, que podem ser adquirido junto da VIROTECH. Em alternativa, é disponibilizado um modelo de avaliação como folha de cálculo de uso corrente. As concentrações calculadas indicam sempre as concentrações reais do soro não diluído caso este tenha sido diluído no teste na proporção de 1:100. Quando um soro é testado numa outra diluição, o cálculo das concentrações tem de ser correspondentemente ajustado.

10. Literatura

1. Epidemiologisches Bulletin, 27/2002
2. Stark K, Schonfeld C, Barg J, Molz B, Vornwald A, Bienzle U, Seroprevalence and determinants of diphtheria, tetanus and poliomyelitis antibodies among adults in Berlin, Germany, Vaccine 17(7-8): 844-50 (1999)
3. Pietsch M et.al. , Influence of information campaigns on the vaccination immunity among the population of a small town area – seroepidemiological results of the „Wittlich Vaccination Study“; Gesundheitswesen 64 (1): 60-4 (2002)
4. Epidemiologisches Bulletin, 7/2002
5. Epidemiologisches Bulletin, 19/1999
6. Epidemiologisches Bulletin, 40/1998
7. Epidemiologisches Bulletin, 28/2001
8. Epidemiologisches Bulletin, 23/1999
9. Werner, G. T., et. al., Tetanusimmunität im Alter, Zeitschrift für Gerontologie, 16, 130-133 (1983)
10. Müller, H. E. et al., Tetanus-Schutzimpfung-Indikation und Kontraindikation, Dtsch. med. Wsch. 113 (1988), 1326-1328
11. Schröder, J. P. et al., Vermeidung hyperergischer Reaktionen bei Tetanus-Impfungen durch Einsatz eines wissenschaftsbasierten Systems bei Fragen der Impfnötigkeit, Klin. Lab. 1992, 38:229-233
12. Plikaytis et al., Comparisons of Standard Curve-Fitting Methods To Quantitate Neisseria meningitidis Group A Polysaccharide Antibody Levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 1991, J Clin Microbiol, 29, p1439-1446
13. Arbeitskreis Immunprophylaxe, Koordinator M. Pietsch: Infektionsschutz durch Impfprophylaxe, Storck Medien & Verlag KG, Bruchsal 1999

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**
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)

Realização do teste

