



ANTI-CARDIOLIPIN ANTIBODIES (ACA-IgG/IgM)

COD 44780 96 Determinações

CONSERVAR A 2-8°C

Reagentes para a determinação de anticorpos anticardiolipina (ACA)
Só para uso *in vitro* em laboratório clínico

ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINA (ACA)

Enzimoimunoensaio
PROVA NA MICROPLACA

FUNDAMENTO DO MÉTODO

Los anticorpos anticardiolipina (ACA) do soro, em presença de β -glicoproteína I, unem-se à cardiolipina adsorvida à superfície dos poços da microplaca. A continuação, incuba-se com um anticorpo antiIgG ou antiIgM humanas conjugado com peroxidase. Finalmente, acrescenta-se o cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) com H_2O_2 , substrato que proporciona um produto solúvel de cor amarela. A reacção enzimática é detida com ácido sulfúrico e a formação de produto mede-se a 450 nm. A concentração de anticorpos na amostra é proporcional à absorvância do produto na reacção¹.

CONTEÚDO E COMPOSIÇÃO

- A. Tampão de Lavagem Concentrada.** 100 mL. Tampão fosfatos concentrado, azida de sódio 15 mmol/L, pH 7,2.
- B. Diluente de Amostra.** 50 mL. Tampão fosfatos 10 mmol/L, cloreto de sódio 130 mmol/L, azida de sódio 15 mmol/L e soro bovino. Corado azul.
- C+. Controlo Positivo IgG.** 1 mL. Pronto para ser utilizado. Soro com anticorpos anticardiolipina tipo IgG, azida de sódio 15 mmol/L. Tampão amarelo.
- C+. Controlo Positivo IgM.** 1 mL. Pronto para ser utilizado. Soro com anticorpos anticardiolipina tipo IgM, azida de sódio 15 mmol/L. Tampão violeta.
- C-. Controlo Negativo.** 2 mL. Pronto para ser utilizado. Soro humano livre de anticorpos anticardiolipina, azida de sódio 15 mmol/L. Tampão incolor.
- DG. Conjugado IgG.** 6 mL. Antiimunoglobulina G humana conjugada com peroxidase. Corado amarelo.
- DM. Conjugado IgM.** 6 mL. Antiimunoglobulina M humana conjugada com peroxidase. Corado violeta.
- E. Substrato.** 12 mL. 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- F. Solução de Paragem.** 15 mL. Ácido sulfúrico 0,5 mol/L.
- M. Microplaca:** 96 poços separáveis individualmente recobertos com cardiolipina.
- S1G-S6G. Padrões ACA IgG,** calibrados usando unidades standard do anticardiolipina (unidades GPL). 1 mL, prontos para serem utilizados. Soro humano com anticorpos antifosfolípidios tipo IgG, azida de sódio 15 mmol/L. As concentrações de ACA IgG são 0, 10, 20, 50, 100 e 200 GPL, conforme o indicado na etiqueta. Tampão amarelo.
- S1M-S6M. Padrões ACA IgM,** calibrados usando unidades standard do anticardiolipina (unidades MPL). 1 mL, prontos para serem utilizados. Soro humano com anticorpos antifosfolípidios tipo IgM, azida de sódio 15 mmol/L. As concentrações de ACA IgM são 0, 10, 20, 50, 100 e 200 MPL, conforme o indicado na etiqueta. Tampão violeta.

Os soros humanos utilizados na preparação dos padrões, do controlo negativo e do controlo positivo eram negativos para o antígeno HBs e para os anticorpos anti-HCV e anti-HIV. No entanto, os padrões e os controlos devem ser tratados com precaução como potencialmente infecciosos.

CONSERVAÇÃO

Conservar a 2-8°C.

Os componentes são estáveis até à data de caducidade indicada na etiqueta sempre que se conservem bem fechados e se evite a contaminação durante o seu uso.

Indicações de deterioração:

- Reagentes: Presença de partículas, turvação.
- Microplaca: Roturas no pacote contentor, defeitos macroscópicos como raladuras na base do poço.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão de Lavagem. Efectuar uma diluição 1/20 do Tampão de Lavagem Concentrada (A) com água destilada e misturar. Necessitam-se aproximadamente 50 mL de Tampão de Lavagem para a lavagem de uma tira. Uma vez diluído, o reagente é estável 7 dias a 2-8°C (Nota 1).

Os outros componentes estão prontos para serem utilizados.

EQUIPAMENTO ADICIONAL

- Câmara húmida
- Aspirador multicanal ou lavagem automática de microplacas
- Leitor de microplacas ou fotómetro com microcuvete e filtro de 450 ± 10 nm

AMOSTRAS

Soro ou plasma recolhidos através de procedimentos standard. Estável 1 semana a 2-8°C.

Diluir as amostras 1/50 no Diluente de Amostra (B) antes do ensaio.

PROCEDIMENTO

1. Temperar os componentes do kit à temperatura ambiente.
2. Abrir a bolsa da microplaca e retirar a quantidade necessária de poços (Nota 3).
3. **Determinação quantitativa:** Pipetar 50 μ L de cada um dos padrões IgG (S1G-S6G), ou dos padrões IgM (S1M-S6M), do Controlo Positivo IgG (C+1) ou do Controlo Positivo IgM (C+2), Controlo Negativo (C-) e das amostras diluídas nos diferentes poços.
Determinação qualitativa: Pipetar 50 μ L do Controlo Positivo IgG (C+1) ou do Controlo Positivo IgM (C+2), do Controlo Negativo (C-) e das amostras diluídas nos diferentes poços. Pipetar 100 μ L do Diluente de Amostra (B) em um para o branco.
4. Incubar os poços durante 30 minutos na câmara húmida à temperatura ambiente.
5. Aspirar o líquido e lavar os poços com 300 μ L de Tampão de Lavagem durante uns 10 segundos 4 vezes (Notas 4 e 5).
6. Pipetar 50 μ L de Conjugado IgG (DG, amarelo) ou de Conjugado IgM (DM, violeta) em cada um dos poços (Nota 6).
7. Incubar os poços como no passo 4.
8. Lavar como no passo 5.
9. Pipetar 50 μ L de Substrato (E) em cada um dos poços.

10. Incubar as tiras durante 10 minutos à temperatura ambiente na câmara húmida.
11. Pipetar 100 µL de Solução de Paragem (F) em cada um dos poços (Nota 7).
12. a absorvância do conteúdo de cada poço a 450 nm usando o Padrão S1G ou S1M, ou o branco para o ajuste a 0. A cor é estável durante ao menos 1 hora.

CÁLCULOS

Determinação quantitativa. Representar graficamente os valores de absorvância obtidos para os Padrões frente às suas respectivas concentrações de anticorpos anticardiolipina (unidades GPL ou MPL). A concentração de anticorpos anticardiolipina na amostra é calculada por interpolação da absorvância na curva de calibração.

Determinação qualitativa. Calcular a absorvância do Valor Discriminante aplicando a seguinte fórmula:

$$A_{450 \text{ nm}} \text{ Valor Discriminante} = A_{450 \text{ nm}} \text{ Controlo Positivo} \times \text{Factor}$$

O valor do factor (F) vem indicado na etiqueta do Controlo Positivo.

Calcular a razão de absorvâncias aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{Razão de absorvância} = \frac{A_{450 \text{ nm}} \text{ da Amostra}}{A_{450 \text{ nm}} \text{ do Valor Discriminante}}$$

Quando forem obtidos valores de absorvância acima do limite superior da escala do leitor de microplacas, diluir a amostra com o Diluente de Amostra (B) e repetir a operação.

VALORES DE REFERÊNCIA

Consideram-se positivas as amostras com concentrações superiores a 18 GPL ou MPL ou com razão de absorvância superior a 1,2.

Consideram-se negativas as amostras com concentrações inferiores a 12 GPL ou MPL ou com razão de absorvância inferior a 0,8.

As amostras com concentrações compreendidas entre 12 e 18 GPL ou MPL ou com razões compreendidas entre 0,8 e 1,2 devem ser consideradas duvidosas e recomenda-se a repetição do ensaio ou a determinação de parâmetros alternativos de valor diagnóstico.

Estes valores ocorrem a título orientativo; é recomendável que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência.

CONTROL DE CALIDAD

O valor de absorvância do Padrão 0 GPL (S1G) ou 0 MPL (S1M) deve ser inferior a 0,4.

A concentração do Controlo Positivo (C+) deve ser superior a 40 GPL ou MPL e a do Controlo Negativo (C-) deve ser inferior a 12 GPL ou MPL.

A razão de absorvância para o Controlo Positivo (C+) deve ser superior a 1,2 e para o Controlo Negativo (C-) deve ser inferior a 0,8.

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio programa de Controlo de Qualidade interno, assim como procedimentos de correção no caso dos controlos não cumprirem com as tolerâncias aceitáveis.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

– Repetitividade (intra):

GPL	CV %	n	MPL	CV%	n
61	12	25	37	13	20
193	14	25	83	16	20

– Reprodutibilidade (inter):

GPL	CV %	n	MPL	CV%	n
61	9	25	37	10	20
193	16	25	83	13	20

– Limite de Detecção: 2,8 GPL e 0,5 MPL

– Escala de medida: 2,8–200 GPL e 0,5–200 MPL. Quando forem obtidos valores superiores, diluir a amostra com o Diluente de Amostra (B) e repetir a medição.

– Veracidade: Os resultados obtidos com estes reagentes não mostram diferenças sistemáticas significativas ao serem comparados com os reagentes de referência. Os detalhes do estudo comparativo estão disponíveis através de solicitação.

– Interferências: O factor reumatóide (300 UI/mL) não interfere. Outras substâncias e medicamentos podem interferir².

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

Embora foram descritos por primeira vez em doentes de lúpus eritematoso sistémico, os anticorpos anticardiolipina estão presentes nos doentes de síndrome antifosfolípidios. Os anticorpos antifosfolípidios reagem com fosfolípidios carregados negativamente, incluída a cardiolipina³. Títulos elevados de anticorpos anticardiolipina IgG ou IgM no soro ou plasma estão associados com um risco aumentado de trombose e embolia pulmonar⁴, e com um importante factor de risco de padecer derrame cerebral⁵ e aborto espontâneo recorrente⁶. Os títulos de anticorpos anticardiolipina podem diminuir durante o tratamento com corticoesteróides⁷.

O diagnóstico clínico não deve ser realizado considerando o resultado de um único ensaio, senão que deve integrar os dados clínicos e de laboratório.

NOTAS

1. Guardar os poços que não forem utilizados no pacote bem fechado juntamente com o saquinho dessecante no seu interior.
2. Ter cuidado de não arranhar a superfície interior dos poços durante todo o procedimento.
3. É importante não deixar restos do Tampão de Lavagem nos poços.
4. A Solução de Paragem (F) detém a reacção enzimática, por isso deve ser pipetada nos poços seguindo a mesma ordem e nos mesmos intervalos de tempo com que foi iniciada a reacção pipetando o Substrato (E) no passo 9.

BIBLIOGRAFIA

1. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997
3. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GR. Anti-phospholipid antibodies Clin Rheum Dis. 1985;11(3):591-609.
4. Ginsburg KS, Liang MH, Newcomer L, Goldhaber SZ, Schur PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis. Ann Intern Med.1992; 117(12): 997-1002.
5. Montalban J, Codina A, Ordi J, Vilardell M, Khamashta MA, Hughes GR. Antiphospholipid antibodies in cerebral ischemia. Stroke 1991; 22(6):750-3.
6. Lynch A, Marlar R, Murphy J, Davila G, Santos M, Rutledge J, Emlen W. Antiphospholipid antibodies in predicting adverse pregnancy outcome. A prospective study. Ann Intern Med. 1994;120(6):470-5
7. Asherson RA and Cervera R. The Antiphospholipid Syndrome. In: Lahita RG, editor. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2000.