



COD 44705 96 Determinações
CONSERVAR A 2-8°C
Regentes para la determinação dos anticorpos antidsDNA Só para uso "in vitro" nos laboratórios clínicos

## ANTICORPOS ANTIdS DNA

Enzimoimunoanálise  
PROVA NA MICROPLACA

### FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os anticorpos antidsDNA (DNA de série dupla) presentes no soro unem-se ao antígeno adsorbido à superfície dos poços da microplaca. A continuação, incuba-se com um anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase. Finalmente, acrescenta-se o cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, substrato que dá lugar a 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 dos anticorpos antidsDNA na amostra é proporcional à absorvância do produto formado<sup>1</sup>.

### CONTEÚDO E COMPOSIÇÃO

- A. **Tampão de Lavagem Concentrada.** 50 mL. Tampão Tris 1,6 mol/L, detergente não iónico 22 g/L, azida de sódio 15 mmol/L, pH 7,4.
- B. **Diluyente da Amostra.** 125 mL. Tampão Fosfato 0,1 mol/L, cloreto de sódio 10 mmol/L, albumina bovina 40 g/L, detergente não iónico 1,11 g/L, azida de sódio 15 mmol/L, pH 7,4. Corado azul.
- C+. **Controlo Positivo.** 1 mL. Pronto a ser utilizado. Soro com anticorpos antidsDNA, azida de sódio 15 mmol/L.
- C-. **Controlo Negativo.** 2 mL. Soro negativo humano para anticorpos antidsDNA, azida de sódio 15 mmol/L.
- D. **Conjugado.** 12 mL. Antiimmunoglobulina G humana conjugada com peroxidase. Corado amarelo.
- 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 dsDNA.

**S1-S6. Padrões AntidsDNA,** calibrados frente ao Padrão Internacional Wo/80 da OMS<sup>2</sup>. 1 mL, pronto a serem utilizados. Soro antidsDNA, azida de sódio 15 mmol/L. As concentrações dos anticorpos antidsDNA são 0, 25, 50, 100, 200 e 300 UI/mL, conforme se indica na etiqueta.

*Os soros humanos utilizados na preparação do controlo positivo e do controlo negativo eram negativos para o antígeno HBs e para os anticorpos antiHCV e antiHIV. No entanto, 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 (M): 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. São necessários aproximadamente 50 mL do Tampão de Lavagem de uma tira. Uma vez diluído, o reagente é estável durante 7 dias a 2-8°C. 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 com filtro de 450 ± 10 nm.

### AMOSTRAS

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

Diluir as amostras 1/100 no Diluyente da Amostra (B) antes do ensaio.

### PROCEDIMENTO

1. Temperar os componentes do kit à temperatura ambiente.
2. Abrir o pacote da microplaca e retirar a quantidade necessária de poços (Nota 1).
3. **Determinação:**
  - **Quantitativa:** Pipetar 100 µL de cada um dos padrões (S1-S6), do Controlo Positivo (C+), do Controlo Negativo (C-) e das amostras diluídas nos diferentes poços.
  - **Qualitativa:** Pipetar 100 µL do Controlo Positivo (C+), do Controlo Negativo (C-) e das amostras diluídas nos diferentes poços. Pipetar 100 µL do Diluyente da Amostra (B) 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 µL do Tampão de Lavagem durante uns 10 segundos 4 vezes (Notas 2 e 3).
6. Pipetar 100 µL do Conjugado (D) em cada um dos poços.
7. Incubar os poços como no passo 4.
8. Lavar como no passo 5.
9. Pipetar 100 µL do Substrato (E) em cada um dos poços.
10. Incubar as tiras durante 15 minutos à temperatura ambiente na câmara húmida.
11. Pipetar 100 µL da Solução de Paragem (F) em cada um dos poços (Nota 4).
12. Medir a absorvância do conteúdo de cada poço a 450 nm usando o Padrão 0 UI/mL (S1) ou o branco para o ajuste a 0. A cor é estável durante, pelo menos, 30 minutos.

## CÁLCULOS

**Determinação quantitativa.** Representar graficamente os valores da absorvância obtidos para os Padrões frente às suas respectivas concentrações de anticorpos anti-dsDNA (UI/mL). A concentração dos anticorpos anti-dsDNA na amostra é calculada por interpolação 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 das absorvâncias aplicando a seguinte fórmula:

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

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

## VALORES DE REFERÊNCIA

São consideradas positivas as amostras com concentrações superiores a 55 UI/mL ou com razão de absorvância superior 1,1.

São consideradas negativas as amostras com concentrações inferiores a 45 UI/mL ou com razão de absorvância inferior a 0,9.

As amostras com concentrações compreendidas entre 45 e 55 UI/mL ou com razões compreendidas entre 0,9 e 1,1 devem ser consideradas duvidosas e recomenda-se a repetição do ensaio ou a determinação de parâmetros alternativos de valor diagnóstico.

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

## CONTROLO DE QUALIDADE

O valor da absorvância do branco deve ser inferior a 0,4.

A concentração do Controlo Positivo deve estar compreendida entre 80 e 120 UI/mL, e a do Controlo Negativo deve ser inferior a 45 UI/mL.

A razão da absorvância para o Controlo Positivo deve ser superior a 1,1 e para o Controlo Negativo deve ser inferior a 0,9.

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

## CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

– Repetitividade (intra-ensaio):

Concentração média	CV	n
56 UI/mL	3,2 %	25
188 UI/mL	7,0 %	25

– Reprodutibilidade (intra-ensaio):

Concentração média	CV	n
56 UI/mL	4,3 %	25
188 UI/mL	14,6 %	25

– Limite de detecção: 1,0 UI/mL

– Intervalo de medida: 1 – 300 UI/mL. Quando forem obtidos valores superiores, diluir a amostra com Diluente da 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 sob solicitação.

– Interferências: O factor reumatóide (300 IU/mL) não interfere. Outras substâncias e medicamentos podem interferir<sup>3</sup>.

## CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

A determinação por enzimoimunoanálise dos anticorpos anti-dsDNA tem uma especificidade para o lúpus eritematoso sistémico por volta de 98 a 100%, e uma sensibilidade entre 40 e 60%<sup>4</sup>. Estes anticorpos têm uma importância especial no curso das manifestações da doença e crêem-se envolvidos nos transtornos renais associados<sup>5</sup>.

O diagnóstico clínico não deve ser realizado considerando apenas 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 os mesmos intervalos de tempo com que se iniciou a reacção pipetando o Substrato (E) no passo 9.

## BIBLIOGRAFIA

1. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Feltkamp TEW, Kirkwood TBL, Maini RN, Aarden LA. The first international standard for antibodies to double stranded DNA. Ann Rheum Dis 1988;47:740-746
3. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997
4. Swaak AJG, Smeenk RJT. Clinical aspects of antibodies to double-stranded DNA. En: Van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996
5. Smeenk RJT, Berden JHM, Swaak AJG. dsDNA antibodies. En: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996