



COD 44704 96 Determinações
CONSERVAR A 2-8°C
Reagentes para a determinação de anticorpos anti gliadina Só para uso <i>in vitro</i> em laboratório clínico

ANTICORPOS ANTIGLIADINA

Enzimoimunoanálise
PROVA NA MICROPLACA

FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os anticorpos anti gliadina presentes no soro unem-se ao antígeno adsorvido à superfície dos poços da microplaca. A continuação, incubam-se com os anticorpos anti IgA humana ou anti IgG humana conjugados com peroxidase. Finalmente, acrescenta-se o cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) com H₂O₂, substrato que proporciona um produto solúvel de cor amarela. A reação enzimática é detida com ácido sulfúrico e a formação de produto mede-se a 450 nm. A concentração de anticorpos anti gliadina na amostra é proporcional à absorvância do produto formado¹.

CONTEÚDO E COMPOSIÇÃO

- A. Tampão de Lavagem Concentrada.** 50 mL. Tampão fosfatos 0,6 mol/L, detergente não iônico 6 g/L, azida de sódio 15 mmol/L, pH 7,6.
- B. Diluente de Amostra.** 125 mL. Tampão fosfatos 30 mmol/L, cloreto de sódio 0,3 mol/L, albumina bovina 5 g/L, detergente não iônico 0,5 g/L, azida de sódio 15 mmol/L, pH 6,7. Corado azul.
- C+. Controlo Positivo IgA.** 1 mL. Pronto para ser utilizado. Soro com anticorpos anti gliadina tipo IgA, azida de sódio 15 mmol/L.
- C+. Controlo Positivo IgG.** 1 mL. Pronto para ser utilizado. Soro com anticorpos anti gliadina tipo IgG, azida de sódio 15 mmol/L.
- C-. Controlo Negativo.** 2 mL. Soro humano negativo para anticorpos anti gliadina, azida de sódio 15 mmol/L.
- DA. Conjugado IgA.** 12 mL. Antiimunoglobulina A humana conjugada com peroxidase. Corado verde.
- DG. Conjugado IgG.** 12 mL. Antiimunoglobulina 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 gliadina.
- S1A-S6A. Padrões Anti gliadina IgA,** calibrados frente a um padrão de referência interno. 1 mL, prontos para serem utilizados. Soro anti gliadina, azida de sódio 15 mmol/L. As concentrações de anticorpos anti gliadina tipo IgA são 0, 10, 20, 50, 100 e 200 U/L, conforme o indicado na etiqueta.
- S1G-S6G. Padrões Anti gliadina IgG,** calibrados frente a um padrão de referência interno. 1 mL, prontos para serem utilizados. Soro anti gliadina, azida de sódio 15 mmol/L. As concentrações de anticorpos anti gliadina tipo IgG são 0, 10, 20, 50, 100 e 200 U/L, conforme o indicado na etiqueta.

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 contendor, defeitos macroscópicos como raladuras na base do poço.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão de Lavagem. Efectuar uma diluição 1/25 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.

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 1/400 no Diluente da 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 1).
3. **Determinação:**
 - **Quantitativa:** Pipetar 100 µL de cada um dos padrões (S1-S6), Controlo Positivo (C+), Controlo Negativo (C-) e amostras diluídas em diferentes poços.
 - **Qualitativa:** Pipetar 100 µL de Controlo Positivo (C+), Controlo Negativo (C-) e amostras diluídas em diferentes poços. Pipetar 100 µL do Diluente de 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 de Tampão de Lavagem durante uns 10 segundos 4 vezes (Notas 2 e 3).
6. Pipetar 100 µL de Conjugado (DA ou DG) em cada um dos poços.
7. Incubar os poços como no passo 4.
8. Lavar como no passo 5.
9. Pipetar 100 µL de Substrato (E) em cada um dos poços.
10. Incubar as tiras durante 15 minutos à temperatura ambiente na câmara húmida.
11. Pipetar 100 µL de 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 ao menos 30 minutos.

CÁLCULOS

Determinação quantitativa. Representar graficamente os valores de absorvância obtidos para os Padrões frente às suas respectivas concentrações de anticorpos anti gliadina (U/L). A concentração de anticorpos anti gliadina 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 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 U/L para IgA e 24 U/L para IgG, ou com razão de absorvância superior a 1,1.

Consideram-se negativas as amostras com concentrações inferiores a 12 U/L para IgA e 16 U/L para IgG, ou com razão de absorvância inferior a 0,9.

As amostras com concentrações compreendidas entre 12 e 18 U/L para IgA, e entre 16 e 24 U/L para IgG, 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 a título orientativo. É recomendável que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência.

CONTROLO DE QUALIDADE

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

A concentração dos Controlos Positivos tanto IgA como IgG deve estar compreendida entre 80 e 120 U/L e a do Controlo Negativo deve ser inferior a 12 U/L para IgA e 16 U/L para IgG.

A razão de 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 interno, assim como procedimentos de correcção no caso dos controlos não cumprirem com as tolerâncias aceitáveis.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

– Repetitividade (intra-ensaio):

U/L IgA	CV %	n
20	5,6	25
76	12,4	25

U/L IgG	CV%	n
45	9,0	25
83	10,5	25

– Reprodutibilidade (interensaio):

U/L IgA	CV %	n	U/L IgG	CV%	n
20	5,7	25	45	8,1	25
76	9,2	25	83	15,2	25

– Limite de detecção: 0,5 U/L (IgA) – 0,2 U/L (IgG)

– Intervalo de medida: 1 – 200 U/L. 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

A determinação por enzimoimunoanálise dos anticorpos anti gliadina tem uma sensibilidade para a doença celíaca de aproximadamente 80 – 90,5% para os anticorpos do tipo IgA, e 100 % para os do tipo IgG. Respeito à especificidade, até um 21% dos indivíduos com outras doenças gastrointestinais diferentes da celiaquia apresentam anticorpos anti gliadina do tipo IgG, e aproximadamente 3% apresentam anticorpos do tipo IgA³. A determinação combinada de anticorpos de ambos tipos mostra uma sensibilidade de 96% e uma especificidade de 97%⁴.

A evolução da concentração destes anticorpos também é útil no seguimento do cumprimento de dietas isentas de glúten.

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. En: 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. Burgin-Wolff A, Berger R, Gaze H, Huber H, Lentze MJ, Nussle D. IgG, IgA and IgE gliadin antibody determinations as screening test for untreated coeliac disease in children, a multicentre study. Eur J Pediatr 1989;148(6):496-502.
4. Catassi C. Gliadin antibodies. En: Peter JB e Shoenfeld E, editores, Autoantibodies, Elsevier Science, 1996.