



COD 44754 96 Determinações
CONSERVAR A 2-8°C
Reagentes para a determinação dos anticorpos anti-transglutaminase tisular (tTG) Só para uso <i>in vitro</i> nos laboratórios clínicos

ANTICORPOS ANTI-tTRANSGLUTAMINASE (Anti-tTG)

Enzimoimunoensaio
PROVA NA MICROPLACA

FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os anticorpos contra a transglutaminase tisular (tTG) presentes no soro ligam-se ao antígeno absorvido à superfície dos poços da microplaca. Posteriormente, incuba-se com anticorpos anti-IgA ou anti-IgG humanas conjugados com peroxidase. Finalmente, acrescenta-se o substrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) em presença de H₂O₂, que ao ser degradada pela peroxidase dá lugar a um produto de cor azul. A reação enzimática é detida com uma solução de ácido sulfúrico e a formação do produto mede-se a 450 nm. A concentração dos anticorpos na amostra é proporcional à absorvância do produto de reação¹.

CONTEÚDO E COMPOSIÇÃO

- A. **Tampão de Lavagem Concentrado.** 50 mL. Tampão Tris 2 mol/L, detergente não iónico 22 g/L, azida de sódio 15 mmol/L, pH 7,4.
- B. **Dilúente da Amostra.** 125 mL. Tampão Tris 0,1 mol/L, cloreto de sódio 110 mmol/L, ureia 2 mol/L, albumina bovina 5 g/L, detergente não iónico 5 g/L, azida de sódio 15 mmol/L, pH 7,4. Corado: azul.
- C+. **Controlo Positivo.** 1 mL. Pronto a utilizar. Soro com anticorpos anti-tTG tipo IgA, azida de sódio 15 mmol/L.
- C-. **Controlo Negativo.** 2 mL. Soro negativo para anticorpos anti-tTG, azida de sódio 15 mmol/L.
- CO. **Controlo de Valor Discriminante IgG.** 1 mL. Pronto a utilizar. Soro com anticorpos anti-tTG tipo IgG, azida de sódio 15 mmol/L.
- DA. **Conjugado IgA.** 12 mL. Anti-imunoglobulina A humana conjugada com peroxidase. Corado: verde.
- DG. **Conjugado IgG.** 3 mL. Anti-imunoglobulina 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 tTG recombinante humana ativada pela gliadina e cálcio.
- S1-S6. **Padrões Anti-tTG IgA,** calibrados diante de um Padrão de Referência Interno. 1 mL, prontos a utilizar. Soro anti-tTG, azida de sódio 15 mmol/L. As concentrações dos anticorpos anti-tTG IgA são 0, 5, 10, 25, 50 e 100 U/mL, conforme se indica 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 contentor, defeitos macroscópicos como raladuras na base do poço.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão de Lavagem. Efectuar uma diluição 1/20 do Tampão de Lavagem Concentrado (A) com água destilada e misturar. São necessários aproximadamente 50 mL de Reagente A para a lavagem de uma tira. Uma vez diluído, o reagente é estável 7 dias a 2-8°C. Os outros componentes estão prontos a utilizar.

EQUIPAMENTO ADICIONAL

- Câmara húmida.
- Aspirador multicanal ou lavador automático de microplacas.
- Leitor de microplacas o fotómetro com microcuvete com filtro de 450 ± 10 nm.

AMOSTRAS

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

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

PROCEDIMENTO

1. Temperar os componentes do kit à temperatura ambiente.
2. Abrir o pacote da microplaca e remova a quantidade de poços requeridos (Nota 1).
3. **Determinação:**
 - **anti-tTG IgA (quantitativa):** Pipetar 100 µL de cada um dos padrões (S1-S6), Controlo Positivo (C+), Controlo Negativo (C-) e amostras diluídas nos diferentes poços.
 - **anti-tTG IgA (qualitativa):** Pipetar 100 µL de Controlo Positivo (C+), Controlo Negativo (C-) e amostras diluídas nos diferentes poços. Pipetar 100 µL de Dilúente da Amostra (B) para o branco.
 - **anti-tTG IgG (qualitativa):** Pipetar 100 µL de Controlo de Valor Discriminante (CO), Controlo Negativo (C-) e amostras diluídas nos diferentes poços. Pipetar 100 µL de Dilúente 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 de Tampão de Lavagem durante uns 10 segundos 4 vezes (Notas 2 e 3).
6. Pipetar 100 µL de Conjugado (DA o DG, dependendo da determinação) 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 os poços 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 utilizando o Padrão 0 U/mL IgA (S1) ou o branco para ajustar a 0. A cor é estável durante, pelo menos, 30 minutos.

CÁLCULOS

Determinação quantitativa Anti-IgA. Representar graficamente os valores de absorvância obtidos para os Padrões diante das suas respectivas concentrações dos anticorpos anti-tTG (U/mL IgA). A concentração dos anticorpos anti-tTG na amostra é calculada pela interpolação na curva de calibração.

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

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

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

Calcular a razão das absorvâncias aplicando a seguinte fórmula:

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

Determinação qualitativa Anti-IgG. Calcular a razão das absorvâncias aplicando a seguinte fórmula:

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

Quando os valores das absorvâncias são mais elevados que o limite superior da escala do leitor da microplaca, as amostras devem ser diluídas com o diluente da amostra (B) e repetir a operação

VALORES DE REFERÊNCIA

Anti-tTG IgA. Amostras com concentrações superiores a 12 U/mL IgA ou com razão de absorvância superior a 1,2 devem ser consideradas positivas.

As amostras com concentrações inferiores a 8 U/mL IgA ou com razão de absorvância inferior a 0,8 devem ser consideradas negativas.

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

Anti-tTG IgG. Amostras com razão de absorvância superior a 1,2 devem ser consideradas positivas. As amostras com razão de absorvância inferior a 0,8 devem ser consideradas negativas.

As amostras com concentrações compreendidas entre 0,8 e 1,2 U/mL devem ser consideradas duvidosas e recomenda-se a repetição do ensaio ou a determinação dos parâmetros alternativos de valor diagnóstico.

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

CONTROL DE QUALIDADE

Anti-tTG IgA. O valor de absorvância do Padrão 0 U/mL IgA (S1) deve ser inferior a 0,4.

A concentração do Controlo Positivo (C+) deve estar compreendida entre 30 e 70 U/mL IgA e a do Controlo Negativo (C-) deve ser inferior a 8 U/mL IgA.

A razão da absorvância para o Controlo Positivo (C+) deve ser > 1,2 e para o Controlo Negativo (C-) deve ser < 0,8.

Anti-tTG IgG. O valor de absorvância do branco deve ser inferior a 0,4.

A razão da absorvância para o Controlo Negativo (C-) deve ser < 0,8.

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

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

– Repetibilidade (intra-ensaio):

Concentração média	CV	n
10,1 U/mL IgA	7,8 %	25
36,1 U/mL IgA	6,9 %	25

– Reprodutibilidade (inter-ensaio):

Concentração média	CV	n
10,1 U/mL IgA	10,3 %	25
36,1 U/mL IgA	10,0 %	25

– Limite de detecção: 1,7 U/mL IgA

– Intervalo de medida: 1 – 100 U/mL IgA. Quando forem obtidos valores superiores, diluir a amostra com Diluente de Amostra (B) e repetir a medição.

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

– Interferências: O factor reumatoide (300 IU/mL) não interfere. Outras substâncias e medicamentos podem interferir⁵.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La transglutaminase tisular (tTG) é o auto-antígeno principal dos doentes celíacos². Os anticorpos anti-tTG da classe IgA encontram-se nos pacientes com doença celíaca ou dermatite herpetiforme³.

A especificidade dos ensaios ELISA anti-tTG para a doença celíaca é de 94-100% e a sensibilidade é de 92-100%⁴. Para a dermatite herpetiforme, a especificidade é de 98% e a sensibilidade de 89%³.

Devido à incidência elevada da deficiência de IgA em pacientes com doença celíaca⁶, no caso de um resultado negativo para anti-tTG tipo IgA recomenda-se a determinação do anti-tTG tipo IgG.

O diagnóstico clínico não deve basear-se exclusivamente no resultado do ensaio, mas deve integrar-se nos dados clínicos e de laboratório.

NOTAS

1. Guardar os poços que não forem utilizados no pacote bem fechado e 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 que não fiquem restos de Reagente A 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. Em: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Dieterich W et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine* 1997; 3(7):797-801
3. Dieterich W et al. Antibodies to tissue transglutaminase as serologic markers in patients with dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol* 1999; 113:133-136
4. Collin P. New diagnostic findings in coeliac disease. *Ann Med* 1999; 31:399-405
5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997
6. Cataldo F. et al. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. *Gut* 1998; 42:362-365