



COD 44775 96 Determinações
CONSERVAR A 2-8°C
Reagentes para a determinação de anticorpos ENA Só para uso <i>in vitro</i> em laboratório clínico

ENA 4-PROFILE

Enzimoimunoanálise
PROVA NA MICROPLACA

FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os anticorpos específicos para ENA do soro unem-se aos antígenos adsorvidos à superfície dos poços da microplaca. A continuação, incubam-se com um anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase. Finalmente, acrescenta-se o cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) com H₂O₂, 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 na amostra é proporcional à absorvância do produto na reacção¹.

CONTEÚDO E COMPOSIÇÃO

- A. Tampão de Lavagem Concentrada.** 50 mL. Tampão Tris 2 mol/L, detergente não iónico 22 g/L, azida de sódio 15 mmol/L, pH 7,4.
- B. Diluente da Amostra.** 125 mL. Tampão Tris 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 utilizar. Soro humano com anticorpos anti-SSA (Ro).
- C+. Controlo Positivo.** 1 mL. Pronto a utilizar. Soro humano com anticorpos anti-SSB (La).
- C+. Controlo Positivo.** 1 mL. Pronto a utilizar. Soro humano com anticorpos anti-Sm.
- C+. Controlo Positivo.** 1 mL. Pronto a utilizar. Soro humano com anticorpos anti-Sm/RNP.
- C-. Controlo Negativo.** 2 mL. Pronto a utilizar. Soro humano negativo para anticorpos antiSSA (Ro), SSB (La), Sm e Sm/RNP, azida de sódio 15 mmol/L.
- D. Conjugado.** 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:**
 - 24 poços separáveis individualmente recobertos com SSA(Ro) nativo. Cor verde.
 - 24 poços separáveis individualmente recobertos com SSB (La) recombinante. Cor amarela.
 - 24 poços separáveis individualmente recobertos com Sm nativo. Cor azul.
 - 24 poços separáveis individualmente recobertos com Sm/RNP nativo. Cor vermelha.

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 deterioro:

- 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 uns 50 mL do Tampão de Lavagem para cada tira. Estável 7 dias a 2-8°C.

Os outros componentes estão prontos a utilizar.

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 Diluente da Amostra (B) antes do ensaio.

PROCEDIMENTO

1. Temperar os componentes do kit à temperatura ambiente.
2. Abrir os pacotes das tiras e montar a quantidade necessária no suporte para os poços fornecidos (Nota 1). As cores identificam a especificidade dos antígenos imobilizados nos poços.
3. Pipetar 100 µL de cada um dos controlos e amostras diluídas nos diferentes poços. Pipetar 100 µL do Diluente da Amostra (B) num poço 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 10 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 poço do branco para o ajuste do zero. A cor é estável durante, pelo menos, 30 minutos.

CÁLCULOS

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:

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

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 razão de absorvância superiores a 1,1

São consideradas negativas as amostras com razão de absorvância inferiores a 0,90

Os valores compreendidos entre 0,90 e 1,1 devem ser considerados duvidosos e recomenda-se a repetição do ensaio.

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 razão da absorvância para o Controlo Positivo deve ser superior a 1,1 e para o Controlo Negativo deve ser inferior a 0,90.

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 DO ENSAIO

- Especificidade: Os soros de referência "ANA Human Reference Sera" AF/CDC-2, AF/CDC-4, AF/CDC-5 e AF/CDC-7, do Centers for Disease Control (CDC), Atlanta, USA, mostram resultados positivos ao serem ensaiados nos poços de especificidade apropriada.
- 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 interferir².

CARATERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

A presença de títulos elevados de anticorpos anti-SSA (Ro) é indicativa de Síndrome de Sjögren primário e de Lúpus Eritematoso Sistémico. Estes anticorpos encontram-se, aproximadamente, num 60-70% de pacientes com Síndrome de Sjögren e num 40-50% de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico^{3,4}.

A presença de títulos elevados de anticorpos anti-SSB (La) é indicativa de Síndrome de Sjögren primário e de Lúpus Eritematoso Sistémico. Estes anticorpos encontram-se, aproximadamente, num 10-40% de pacientes com Síndrome de Sjögren e num 6-15% de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico^{5,6}.

A presença de títulos elevados de anticorpos anti-Sm é indicativa de Lúpus Eritematoso Sistémico. Estes anticorpos encontram-se, aproximadamente, num 20-30% de pacientes com a doença^{7,8}.

A presença de títulos elevados de anticorpos anti-Sm/RNP é indicativa de Lúpus Eritematoso Sistémico e de Doença Mista do Tecido Conectivo. Estes anticorpos encontram-se, aproximadamente, num 30-40% de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico e num 100% de pacientes com a Doença Mista do Tecido Conectivo^{7,9}.

O diagnóstico clínico não deve ser realizado considerando exclusivamente o resultado do 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. 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. Manoussakis MN, Kistis KG, Liu X, Aidinis V, Gualis A and Moutsopoulos HM. Detection of anti-Ro(SSA) antibodies in autoimmune diseases: comparison of five methods. British Journal of Rheumatology 1993; 32: 449-455
4. Reichlin M and Scofield RH. SSA(Ro) autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Shoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
5. Tzioufas AG and Moutsopoulos HM. Clinical significance of autoantibodies to Ro/SSA and La/SSB. In: van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996.
6. Wahren M, Téngner P, Gunnarsson I, Lundberg I, Hedfors E, Ringertz NR and Pettersson I. Ro/SS-A and La/SS-B antibody level variation in patients with Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. J Autoimmun. 1998 Feb;11(1):29-38.
7. Peng SL and Craft JE. Spliceosomal snRNPs autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Shoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
8. Bernstein R. Autoantibodies to histones, Sm and ubiquitins. In: van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996
9. Van Venrooij WJ and Sillekens PTG. Small nuclear RNA associated proteins: autoantigens in connective tissue diseases. Clinical and Experimental Rheumatology 1989; 7: 635-645