



COD 44740 96 Determinações
CONSERVAR A 2-8°C
Reagentes para a determinação dos anticorpos ENA Só para uso <i>in vitro</i> nos laboratórios clínicos

ENA 6-SCREENING

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 antiIgG 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 específicos ENA.
- C-. Controlo Negativo.** 2 mL. Pronto a utilizar. Soro humano negativo para anticorpos antiSSA(Ro), SSB(La), Sm, Sm/RNP, antiJo1 e antiScl70, 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:** 96 poços separáveis individualmente recobertos com uma mistura de antígenos Sm/RNP e SSA(Ro) nativos e antígenos SSB(La), Jo1 e Scl70 recombinantes.

Os soros humanos utilizados na preparação do controlo positivo, 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 contendor, defeitos macroscópicos como raladuras na base do poço.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão de Lavagem. Diluir o Tampão de Lavagem Concentrada (A) com água destilada em proporção 1/20. Misturar bem. São necessários uns 50 mL do Tampão de Lavagem para cada tira. Estável 7 dias a 2-8°C.

O resto dos Reagentes está pronto 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 da microplaca (M) e retirar a quantidade necessária dos poços requeridos (Nota 1).
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:

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

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

Calcular a razão da 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

Consideram-se positivas as amostras com razão de absorvância superiores a 1,1

Consideram-se 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 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, AF/CDC-7, AF/CDC-9 e AF/CDC-10 do Centers for Disease Control (CDC), Atlanta, USA, mostram resultados positivos
- 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.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

A presença de títulos elevados de anticorpos específicos para ENA é indicativa de doenças reumáticas sistémicas como lúpus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren primário, esclerodermia, polimiosite, doença mista do tecido conectivo ou artrite reumatóide. Em alguns casos, as amostras com um elevado título de anticorpos específicos para ENA correspondem a indivíduos com um quadro clínico normal. Ao contrário, em outros casos, pacientes com doenças reumáticas sistémicas podem ter níveis indetectáveis desses anticorpos^{3,4}.

É recomendável que os soros que resultarem positivos para ENA sejam ensaiados com os kits individuais para determinar o anticorpo específico.

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 que não fiquem 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. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996
4. Charles PJ and Maini RN. Enzyme-linked immunosorbent assay in rheumatological laboratory. In: van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996