



SISTEMA DE TESTE RELISA® PR3-ANCA PARA ANTICORPOS ANTI-PROTEINASE 3

Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso profissional

Número de Catálogo: 7096-16

USO PRETENDIDO: Este é um sistema de imunoenensaio enzimático para detecção de anticorpos anti-proteinase 3 (PR3) em soro humano. Este sistema de teste deve ser usado como auxiliar na detecção de anticorpos associados com granulomatose com poliangiite e outras vasculites.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Os autoanticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) são um grupo de anticorpos que reagem com antígenos do citoplasma de neutrófilos humanos. Embora esses anticorpos tenham sido relatados pela primeira vez em 1964 (1), o primeiro relato que os ligou à doença apareceu em 1982, quando Davies et al. relataram os anticorpos em oito pacientes com glomerulonefrite necrosante segmentar (2). Em 1984, foram relatados mais quatro pacientes com vasculite e glomerulonefrite. Em 1985, van der Woude *et al.* mostraram que o ANCA tinha alta associação com a granulomatose com poliangiite, e que o título de anticorpos correlacionou-se com a atividade da doença (3). Em 1988, Falk e Jennette relataram que o ANCA tem mais que uma especificidade para antígeno (4). Um relato subsequente mostrou que a especificidade do ANCA correlacionava-se com as características patológicas da vasculite (5).

A triagem de ANCA é, em geral, realizada com um ensaio imunofluorescente indireto. Nesse teste, vários padrões de coloração celular podem ser encontrados. Dois importantes padrões de coloração foram descritos e bem caracterizados quando os neutrófilos fixados em etanol são usados no teste imunofluorescente para ANCA. Os autoanticorpos que mostram fino padrão citoplasmático granular, denominados C-ANCA, em geral são direcionados contra a serina protease, Proteinase 3 (PR-3). Esses autoanticorpos demonstraram ter alta associação com a granulomatose com poliangiite. Ou outro padrão de coloração importante, o perinuclear, ou padrão P-ANCA, que normalmente se deve a anticorpos direcionados contra mieloperoxidase (MPO), foi associado a vasculite sistêmica e glomerulonefrite necrosante idiopática e glomerulonefrite em crescente (4). Todas as amostras que apresentam teste imunofluorescente indireto positivo devem ser confirmadas como MPO-ANCA ou usando imunoenensaio enzimático (EIA) para PR3-ANCA. Alguns autores acham que as amostras de pacientes com suspeita clínica devem ser testadas por EIA, uma vez que 5% das amostras são positivas apenas por EIA (6). Embora os PR3-ANCA sejam mais comuns em pacientes com granulomatose com poliangiite (até 85% dos pacientes), eles não são específicos para essa doença, porque também podem ser vistos em uma porcentagem menor de pacientes com glomerulonefrite necrosante e em crescente idiopática. Da mesma maneira, os MPO-ANCA são associados a glomerulonefrite necrosante em crescente em até 65% dos pacientes, mas também podem ser vistos em uma porcentagem menor de pacientes com granulomatose com poliangiite. Tanto o MPO-ANCA quanto o PR3-ANCA podem ser vistos na poliangiite microscópica, cada uma delas, em aproximadamente 45% dos pacientes (7, 8, 9).

PRINCÍPIO DO TESTE

Este teste é um EIA indireto semiquantitativo. Os antígenos PR3 humanos estabilizados foram usados para revestir a superfície dos micropoços, visando servir como substrato antigênico nesse sistema. As amostras diluídas dos pacientes são colocadas nos micropoços e incubadas, permitindo que os anticorpos específicos da amostra reajam com o antígeno na fase sólida. Depois de lavagem para remover os anticorpos não-ligados e outras proteínas do soro, os poços são incubados com anticorpos anti-humanos de cabra marcados com *horseradish* peroxidase. A preparação de anticorpo conjugado a horseradish peroxidase que é incluída no sistema de teste é específica para IgG de cadeias gama.

Depois da incubação com o conjugado HRP, forma-se um complexo estável de três partes se os resultados forem positivos. Este complexo consiste no anticorpo anti-humano conjugado com HRP ligado aos anticorpos anti-PR3, que é ligado ao antígeno estabilizado na superfície de plástico.

Após outra etapa de lavagem, esse complexo é detectado adicionando-se uma solução de tetrametilbenzidina (TMB) e H_2O_2 como substrato cromogênico. O grau de desenvolvimento de cor em cada poço é proporcional à concentração de anticorpos anti-PR3 em cada amostra de soro. Cada micropoço é lido em um espectrofotômetro em 450 nm.

COMPONENTES DO SISTEMA - MATERIAIS FORNECIDOS

Armazenamento: Todos os componentes podem ser armazenados em refrigeração de 2 °C a 10 °C. Não congelar.

Estabilidade: Todos os componentes continuam estáveis por pelo menos 12 meses a partir da data de fabricação. Não utilize qualquer componente depois de sua data de validade.

REAGENTES REATIVOS

Tiras de micropoços RELISA® revestidos com PR3 PLATE: No do Catálogo 7008-16. Um suporte de micropoços com 12 tiras de 8 poços revestidos de PR3 humano. Essas tiras são codificadas na cor verde. Se forem necessários menos de oito poços para o teste, os poços podem ser destacados. As tiras não utilizadas podem ser recolocadas na bolsa de papel alumínio com a bolsa de agente dessecante, vedada com o fecho tipo zíper e refrigerada por até 45 dias.

Diluinte da amostra RELISA® SOLN|DIL: Número de Catálogo 7100 (100 ml). Diluinte tamponado de amostra patenteado para diluir amostras de pacientes.

Reagente de anticorpo enzimático RELISA® - Específico para IgG humana CONJ|HRP: Número de Catálogo 7009-16 (14 ml). IgG anti-humana (cadeia gama específica) conjugada a *horseradish* peroxidase (HRP). O reagente vem pronto para usar.

Soros padrões PR3 RELISA® CAL: Números de Catálogo 7261-16, 7262-16, 7263-16, 7264-16, 7265-16 (2 ml cada). Soros humanos que contêm anticorpo anti-PR3. O valor desse ensaio para cada um desses soros é informado na etiqueta do frasco. Esses soros estão na diluição de trabalho e estão prontos para o uso.

Controle positivo RELISA® PR3 CONTROL|+: Número de Catálogo 7021-16 (2 ml). Soro humano de controle positivo que contém anticorpos anti-PR3. Este soro está na diluição de trabalho e é pronto para usar.

Controle negativo RELISA® CONTROL|-: Número de Catálogo 7031 (2 ml). Soro humano de controle negativo que não contém anticorpos anti-PR3. Este soro está na diluição de trabalho e é pronto para usar.

Controle positivo testado RELISA® opcional para PR3 OPT+: Número de Catálogo 7022-16 (0,25 ml). Soro humano de controle positivo que contém anticorpos anti-PR3. Tratar este controle positivo como soro não diluído. O valor do ensaio para este soro está declarado na etiqueta do frasco.

Solução de substrato RELISA® SOLN|SUB: Número de Catálogo 7035 (14 ml). Solução de substrato enzimático específico para HRP, contendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) estabilizada e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O reagente vem pronto para usar.

Reagente de parada RELISA® SOLN|STOP: Número de Catálogo 7033 (14 ml). Reagente de parada patenteado para sistemas de testes EIA da Immuno Concepts. O reagente vem pronto para usar. **CUIDADO**: Corrosivo. Esse reagente contém ácido clorídrico e ácido sulfúrico e devem ser manuseados com cuidado. Manter fora do alcance das crianças. Em caso de contato com os olhos, enxágue imediata e completamente com água e consulte um médico. Nunca adicione água a esse reagente.

COMPONENTES NÃO-REATIVOS

Suporte para os micropoços

Solução tampão de lavagem:

Tampão PBS PWDR|PBS: Número de Catálogo 1011. Solução salina tamponada com fosfato em pó (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contém pó de tampão suficiente para fazer 1 litro. (Para cada placa de 96 micropoços são fornecidas duas bolsas de tampão em pó no kit completo do teste).

Concentrado de solução tampão de lavagem SOLN|WASH: Número de Catálogo 1031 (10 ml). Solução Tween 20 a 5% para ser usada como tampão de lavagem. (Para cada placa de 96 micropoços são fornecidos dois frascos de tampão concentrado no kit completo do teste).

Preparação: Dissolver uma bolsa de tampão em pó em um litro de água desionizada ou destilada. Adicionar todo o conteúdo de um frasco de Concentrado de solução tampão de lavagem ao PBS dissolvido. Misturar bem e armazenar entre 2°C e 25°C por até quatro semanas ou até que ocorram sinais de contaminação ou outras alterações visíveis. A solução tampão de lavagem deve estar em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) antes do uso.

MATERIAIS ADICIONAIS NECESSÁRIOS - PORÉM NÃO FORNECIDOS

Pipetadores de precisão volumétrica para dispensar volumes de 25-1000 µl
Almotolia para dispensar solução tampão de lavagem nos micropoços ou sistema de lavagem automática dos micropoços
Recipiente de um litro para solução tampão PBS de lavagem
Água desionizada e destilada
Espectrofotômetro de leitura de placa capaz de ler absorbância em 450 nm
Tubos de ensaio para preparar diluições de soro
Papel absorvente ou papel-toalha
Pipetadores multicanais capazes de dispensar em 8 poços
Luvas descartáveis
Temporizador de laboratório

PRECAUÇÕES

1. Todos os materiais de origem humana usados neste produto foram testados e foram negativos (não-reativos repetidamente) para anticorpos para o vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1), vírus da imunodeficiência humana-2 (HIV-2), vírus da hepatite C (HCV) e para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), segundo métodos aprovados pela FDA. Contudo, nenhum método de teste pode oferecer garantia total de que HIV-1, HIV-2, hepatite C, hepatite B ou outros agentes infecciosos estejam ausentes. Assim, todos os materiais do kit devem ser manuseados da mesma maneira que materiais com potencial infeccioso.
2. Todas as amostras de pacientes devem ser manuseadas no nível de Biossegurança 2, conforme as recomendações para amostras de soro ou sangue humano com potencial infeccioso constantes no Manual dos Centers for Disease Control/National Institutes of Health: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. A diluição dos componentes ou a substituição dos componentes além dos fornecidos com o sistema podem gerar resultados inconsistentes.
4. A azida sódica (0,09%) é usada como conservante. A azida sódica pode reagir com instalações hidráulicas de chumbo ou cobre e formar sais de azida metálica explosivos. Ao descartar os reagentes, enxaguar com grandes volumes de água corrente para evitar possíveis resíduos no encanamento. A azida sódica é um veneno e pode ser tóxica quando ingerida.
5. Este kit destina-se ao uso para diagnóstico *in vitro*.

6. Nunca pipetar com a boca e evitar o contato dos reagentes e amostras com a pele e a mucosa. Se ocorrer contato, lavar com sabão germicida e quantidade abundante de água.
7. Não fumar, comer ou beber nas áreas em que as amostras ou reagentes do kit são manuseados.
8. Evitar respingos ou geração de aerossóis todas as vezes.
9. Os tempos e temperaturas de incubação além dos especificados podem gerar resultados errôneos.
10. A contaminação cruzada de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos. As amostras devem ficar confinadas aos micropoços durante o teste.
11. A vidraria reutilizável deve ser lavada e totalmente enxaguada, de modo a remover todo o detergente antes do uso. Toda a vidraria deve ser limpa e seca antes do uso.
12. Deixar todos os reagentes, micropoços e amostras chegarem à temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) antes de usar.
13. Usar luvas descartáveis ao manusear amostras e reagentes, e lavar completamente as mãos depois.
14. A contaminação microbiana de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos.
15. O reagente de parada é corrosivo e pode causar queimaduras. Esse reagente contém ácido clorídrico e ácido sulfúrico e devem ser manuseados com cuidado. Manter fora do alcance das crianças. Em caso de contato com os olhos, enxágue imediata e completamente com água e consulte um médico. Nunca adicione água a esse reagente.

COLETA DE AMOSTRA

Coleta: O soro é a amostra preferida. Cerca de 5 ml de sangue total devem ser coletados de modo asséptico, por punção venosa com tubo de coleta estéril e a vácuo ou com outro sistema de coleta adequado. Deixar o sangue coagular em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C). O soro deve ser separado do coágulo por centrifugação, assim que possível para minimizar a hemólise.

Substâncias interferentes: O soro que apresenta alto grau de hemólise, bile, lipemia ou crescimento microbiano não deve ser usado porque essas condições podem ocasionar resultados aberrantes. As amostras que contêm matéria particulada visível devem ser clareadas por centrifugação antes dos testes.

Armazenamento: O soro pode ser armazenado de 2 °C a 10 °C por até uma semana. Se os testes demorarem mais que isso, o soro deve ser armazenado congelado a -20 °C ou menos. O soro não deve ser armazenado em refrigerador ou freezer com autodescongelamento.

CUIDADO: O congelamento e descongelamento repetitivo das amostras dos pacientes podem gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos.

NOTAS GERAIS SOBRE O PROCEDIMENTO

1. É extremamente importante deixar todos os componentes do kit e as amostras de soro em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) antes de usar. Um litro inteiro de tampão de lavagem pode demorar várias horas para aquecer até 20 °C depois de ser removido do refrigerador. As temperaturas de incubação acima ou abaixo da faixa determinada podem causar resultados imprecisos. Recolocar as amostras e reagentes não usados no armazenamento refrigerado.
2. Misturar bem os reagentes antes de usar, invertendo os frascos suavemente. Não usar vórtex nem agitar os reagentes. Evitar produção de espuma.
3. Ao preparar diluições de amostra, as pontas da pipeta devem ser limpas primeiro, para dispensar o soro no diluente da amostra. O excesso de amostra que adere ao lado externo da ponta da pipeta afeta os resultados.
4. O uso de pipetador multicanais é recomendado porque proporciona dispensação do reagente, tempos de incubação e tempos de reação mais uniformes.
5. **A lavagem apropriada dos poços é de extrema importância.** Os poços inadequadamente lavados apresentam altos valores de fundo e pode mostrar valores falso-positivos. Na lavagem manual, aspirar o conteúdo dos poços e, a seguir, encher cada poço com solução tampão de lavagem. Evitar a contaminação cruzada dos poços, em especial na primeira lavagem depois da aspiração. Drenar todo o tampão de lavagem dos poços invertendo-os e impelindo o tampão de lavagem residual para fora dos poços com movimento enérgico do punho. Repetir as etapas de enchimento e drenagem até um total de 3 a 5 lavagens. Os poços devem ser batidos vigorosamente sobre papel-toalha ou material absorvente para remover todos os traços de tampão de lavagem residual. O uso de sistema automático de lavagem de micropoços garante a lavagem uniforme dos poços e é recomendado.
NOTA: Devido aos vários tipos de técnicas de lavagem e de sistemas automáticos, o número de lavagens deve ser ajustado de modo a se obter os resultados ideais. Cada laboratório deve determinar o número mais eficiente de lavagens para seu sistema.

6. A remoção imprópria de tampão de lavagem residual pode causar desenvolvimento irregular das cores. As tiras de micropoços devem ser batidas e secas em papel absorvente ou toalhas para minimizar os resíduos de tampão de lavagem.
7. O tempo de todas as etapas é essencial. Todas as amostras de soro devem ser diluídas antes do início do procedimento, e devem ser dispensadas nos micropoços no menor período de tempo possível (não mais de cinco minutos). O tamanho dos lotes deve ser definido de modo que a manipulação das amostras possa ser realizada confortavelmente dentro desse período. O uso de pipetador multicanais facilita o manuseio das amostras e dos reagentes, e é recomendado.
8. Com exceção da última incubação (solução de substrato), o início de cada período de incubação ocorre no término da dispensação da amostra ou do reagente. A incubação da solução de substrato deve ser exatamente 15 minutos para cada poço. Todas as amostras e reagentes devem ser dispensados na mesma sequência e em velocidade constante.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

CÁLCULOS

1. Subtrair o valor de absorbância para o poço de solução de branco do reagente dos valores de absorbância obtidos nos poços do soro padrão, de controle e da amostra do paciente. Calcular os valores de absorbância média para poços duplicados.
2. Fazer o gráfico do valor de absorbância médio de cada padrão na Planilha de determinação de padrão PR3 RELISA[®]. Desenhar a melhor linha de progressão entre os pontos do padrão.
3. Obter o valor unitário de cada amostra de paciente pela interpolação de Linha de padrão.

MÉTODO DE CALIBRAÇÃO DE PONTO ÚNICO OPCIONAL

1. Subtrair o valor de absorbância para o poço de solução de branco do reagente dos valores de absorbância obtidos nos poços do soro padrão, de controle e da amostra do paciente. Calcular os valores de absorbância média para poços duplicados.
2. A concentração de anticorpo específico do Soro padrão n° 3 (declarada na etiqueta) é dividida pelo valor de absorbância média dos poços de calibrador para se obter o fator de conversão.
3. Os valores de absorbância de cada uma das amostras são multiplicados pelo fator de conversão para se obter a concentração do anticorpo específico em unidades.
4. A forma simplificada desses cálculos pode ser expressa como:

$$\frac{\text{Valor padrão n° 3 (Unidades)}}{\text{Absorbância do Padrão n° 3}} \times \text{Absorbância da amostra}^* = \text{Valor unitário para a amostra}$$

*Se os padrões e as amostras forem executados em duplicata, usar a absorbância média dos poços com teste em duplicata.

CONTROLE DE QUALIDADE

1. O valor de absorbância média dos poços de Padrão n° 3 deve ser pelo menos 0,400. Os valores de absorbância inferior a 0,400 indicam desenvolvimento inadequado da cor e, portanto, uma execução inválida. O desenvolvimento de cor inadequada em geral se deve ao uso de reagentes resfriados ou de tempo incorreto em uma ou mais etapas do ensaio. Deixar os reagentes aquecerem até a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C), e repetir a execução prestando atenção especial para o tempo de todas as etapas.
2. O poço de controle de solução de branco deve ter absorbância inferior a 0,150. Os valores de absorbância da solução de branco superiores a 0,150 indicam lavagem inadequada ou contaminação dos reagentes, e uma execução inválida.
3. As amostras com valores de anticorpos específicos superiores ao limite superior do Padrão n° 5 devem ser relatadas como maiores que o valor unitário do Padrão n° 5.
4. A Linha de padrão deve ser desenhada para cada execução (ou o fator de conversão deve ser calculado quando se usa a calibração de ponto simples opcional). Usar a Linha de padrão ou o fator de conversão de uma execução para outra invalida os resultados.
5. Cada laboratório deve estabelecer e manter seus próprios valores de referência (normal), com base na população de pacientes e em outros fatores locais.
6. O soro de controle positivo é soro humano que contém anticorpos anti-PR3. Esse é um controle qualitativo, que deve produzir um resultado superior a 35 unidades.
7. O soro de controle negativo é uma mistura de soro humano que não contém anticorpos anti-PR3. Esse controle deve produzir um resultado inferior a 35 unidades.

8. O soro de controle testado e não diluído é soro humano que contém anticorpos anti-PR3. O valor do ensaio deste controle, em unidades de PR3, está indicado na etiqueta. Essa faixa foi estabelecida de modo a abranger 99% dos valores esperados, devido à variação normal em termos estatísticos. Pequenos desvios ocasionais fora dessas faixas são esperados. Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios de aceitação ou rejeição com base em sua experiência com este ensaio.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO PACIENTE

Este ensaio é semiquantitativo. Demonstrou-se que os níveis de anticorpos anti-PR3 elevam-se e caem conforme o curso da doença, mas a significância de um nível de anticorpo único ainda está sendo estudada (9). Os valores unitários obtidos neste ensaio destinam-se simplesmente a separar os pacientes nos seguintes três grandes grupos. Os poços de amostra do paciente que têm valores calculados inferiores a 35 unidades são considerados positivos. Os poços de amostra do paciente que têm valores calculados inferiores a 35 unidades são considerados negativos. Cada laboratório deve estabelecer sua própria faixa de referência e valores de corte, com base na população de pacientes testados. Os valores unitários são afetados por fatores do paciente, considerações mecânicas (como precisão e correção da pipetagem), e condições do ensaio (como temperatura e tempo transcorridos nas etapas). As determinações em série dos níveis de anticorpo em um paciente podem indicar a elevação ou a queda desses níveis.

LAUDO DE RESULTADOS

Os resultados devem ser relatados como positivos ou negativos para anticorpos anti-PR3, com o valor unitário. Os níveis de anticorpos encontrados em uma única amostra limitaram a significância clínica. As determinações em série dos níveis de anticorpo em um paciente podem indicar elevação ou queda desses níveis, que comprovadamente acompanham o curso da doença.

LIMITAÇÕES DO TESTE

1. O diagnóstico não pode ser feito com base apenas na detecção de anticorpos anti-PR3-ANCA. O médico precisa interpretar esses resultados em conjunto com a história, os sintomas e os achados físicos do paciente e com outros procedimentos de diagnóstico.
2. O tratamento não deve ser iniciado com base unicamente em um teste positivo para anticorpos anti-PR3. As indicações clínicas, outros achados laboratoriais e a impressão clínica do médico devem ser considerados antes de iniciar qualquer tratamento.
3. Os resultados desse teste devem ser usados em conjunto com as informações obtidas na avaliação clínica e em outros procedimentos diagnósticos, para determinar o estado clínico do paciente.

VALORES ESPERADOS

Em uma população normal, o valor esperado é menor que 35 unidades (negativo). Os PR3-ANCA são vistos em até 85% dos pacientes com granulomatose com poliangiite, 45% dos pacientes com poliangeíte microscópica e em uma porcentagem menor de pacientes com glomerulonefrite em crescente e necrosante idiopática (9).

FAIXA DE REFERÊNCIA

A faixa de referência foi estabelecida testando-se soros de 500 doadores de sangue saudáveis, 239 mulheres e 261 homens, nenhum dos quais tinha história conhecida de doenças reumáticas. Com base em uma Curva de operador receptor gerada desses dados, o valor de corte normal foi estabelecido como inferior a 35 unidades de PR3.

Devido à variabilidade inerente aos ensaios ELISA, os valores unitários dentro de cinco unidades acima ou abaixo do valor de corpo positivo/negativo (isto é, entre 30 e 40 unidades) devem ser interpretados com cuidado. Os achados clínicos, sinais, sintomas, a impressão do médico e outros resultados de laboratório devem ser avaliados ao interpretar os resultados deste ensaio.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O Sistema de teste RELISA[®] para PR3 da Immuno Concepts foi comparado com o sistema de teste ELISA para PR3, que é encontrado no comércio. A população estudada consistiu em 173 amostras enviadas a laboratórios clínicos para teste de ANCA, MPO e PR3, mas sem diagnósticos específicos, 10 amostras eram de pacientes com diagnóstico de poliangeíte microscópica, 15 amostras eram de pacientes com diagnóstico de glomerulonefrite necrosante em crescente, 12 amostras eram de pacientes com diagnóstico de poliarterite nodosa, 7 amostras de pacientes com granulomatose eosinofílica com poliangiite, 12 pacientes com diagnóstico de vasculite, 25 pacientes com diagnóstico de granulomatose com poliangiite, 261 amostras de doadores de sangue do sexo masculino e 239 amostras de doadores de sangue do sexo feminino. Todas as amostras foram testadas em paralelo no dispositivo legalmente comercializado e o dispositivo proposto. Com base nessas comparações, foram obtidos os seguintes dados, usando-se a curva de calibração de cinco pontos:

Teste legalmente comercializado para anti-PR3			
Immuno Concepts		Positivo	Negativo
RELISA® PR3	Positivo	179	8
Teste de anticorpo	Negativo	4	563

Esses dados geraram a seguinte estatística: sensibilidade relativa, 97,8%; especificidade relativa 98,6% e equivalência geral, 98,4%.

Entre as 8 amostras “falso-positivas”, 2 mostraram padrão de P-ANCA por imunofluorescência, 4 mostraram padrão de C-ANCA por imunofluorescência e 2 não demonstraram nenhum padrão imunofluorescente. Duas das amostras que mostraram padrão de C-ANCA por imunofluorescência e RELISA® positivo para PR3 eram de pacientes com diagnóstico de granulomatose com poliangiite, e uma das amostras que mostrou padrão de P-ANCA por imunofluorescência e RELISA® positivo para PR3 foi de um paciente com diagnóstico de granulomatose eosinofílica com poliangiite. Essas amostras podem, na verdade, representar resultados “falso-negativos” no dispositivo legalmente comercializado.

Os seguintes dados foram obtidos usando-se um método de calibração de ponto simples opcional:

Teste legalmente comercializado para anti-PR3			
Immuno Concepts		Positivo	Negativo
RELISA® PR3	Positivo	176	4
Teste de anticorpo	Negativo	7	567

Esses dados geraram a seguinte estatística: sensibilidade relativa, 96,2%; especificidade relativa, 99,3% e equivalência geral, 98,5%.

REPRODUTIBILIDADE

A precisão do ensaio foi medida usando-se sete amostras que tinham valores de PR3-ANCA dentro da faixa da curva de calibração. Essas amostras foram executadas em duplicada em três números de lotes diferentes de tiras de micropoços revestidas com antígeno, em três ocasiões diversas por três técnicos distintos. A precisão intraensaio e entre os ensaios é mostrada nas Tabelas seguintes:

PRECISÃO INTRAENSAIO

n = 21	Concentração (unidades)	DP	%C.V.
Amostra 1	125	7	5
Amostra 2	97	8	8
Amostra 3	74	3	4
Amostra 4	65	4	6
Amostra 5	59	4	7
Amostra 6	117	6	5
Amostra 7	240	11	5

PRECISÃO ENTRE ENSAIOS

n = 3	Concentração (unidades)	DP	%C.V.
Amostra 1	125	9	7
Amostra 2	97	7	8
Amostra 3	74	6	9
Amostra 4	65	10	15
Amostra 5	59	8	14
Amostra 16	117	6	14
Amostra 7	240	12	5

LINEARIDADE

Dentro da faixa da curva de calibração, o ensaio é linear, como é demonstrado pelos métodos mostrados no NCCLS Guideline, *Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods* (10).

VALIDAÇÃO DE CALIBRAÇÃO DE UM SÓ PONTO

O uso de um calibrador de um só ponto foi validado com o mesmo grupo de 754 soros que foi usado para a comparação com o dispositivo legalmente comercializado. A análise de regressão dessa comparação mostrou coeficiente de regressão (r^2) de 99,2%, e a análise de variância (ANOVA) dos dados mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois métodos. Do ponto de vista prático, nessa comparação, vemos apenas três amostras (0,4%) que apresentaram discrepâncias diagnósticas entre o sistema de calibração de cinco pontos e o sistema de calibração de um só ponto opcional. Todas essas amostras tinham valores unitários de PR3 próximos do ponto de corte de 35 unidades, variando de 31 a 40 unidades (10). Esse tipo de amostra constitui problema diagnóstico em qualquer sistema de ensaio, e precisa ser considerado cuidadosamente pelos profissionais de laboratório que analisam as amostras e interpretam os dados.

ESTUDOS DE REATIVIDADE CRUZADA

Um total de 40 amostras de soro que continham autoanticorpos diferentes de anti-PR3-ANCA foram testados com o Sistema de teste RELISA[®] para PR3 da Immuno Concepts. Essas amostras incluíam padrões comuns de anticorpo antinuclear, como anticorpos homogêneos, pontilhados e nucleolares, assim como anticorpos contra componentes citoplasmáticos, como mitocôndrias, aparelho de Golgi e o citoesqueleto. Vinte das amostras continham fatores reumatóides. Nenhuma dessas amostras produziu resultado positivo no Sistema de teste RELISA[®] para PR3 da Immuno Concepts.

BIBLIOGRAFIA

1. Faber, V., Elling, P., Norup, G., et al. An Antinuclear Factor Specific for Leucocytes. *Lancet* 2:344-345, 1964.
2. Davies, D.J., Moran, J.E., Niall, J.F., et al. Segmental Necrotising Glomerulonephritis with Antineutrophil Antibody: Possible Arbovirus Aetiology? *Br. Med. J.* 285:606, 1982.
3. van der Woude, F.J., Rasmussen, N., Lobatto, S., et al. Autoantibodies Against Neutrophils and Monocytes: Tool for Diagnosis and Marker of Disease Activity in Wegener's Granulomatosis. *Lancet* 1:425-429, 1985.
4. Falk, R.J., Jennette, J.C. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies with Specificity for Myeloperoxidase in Patients with Systemic Vasculitis and Idiopathic Necrotizing and Crescentic Glomerulonephritis. *N. Engl. J. Med.* 318:1651-1657, 1988.
5. Jennette, J.C., Wilkman, A.S., Falk, R.J. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody-associated Glomerulonephritis and Vasculitis. *Am. J. Pathol.* 135:921-930, 1989.
6. Savage, J., Gillis, D., Benson, E., et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am. J. Clin. Pathol.* 111:507-513, 1999.
7. Kallenberg, C.G.M. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies with Specificity for Myeloperoxidase. In: Peter, J.B. and Shoenfeld, Y., eds. *Autoantibodies*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V. 1996: 53-60.
8. Nölle, B., Specks, U., Lüdemann, J., Rohrbach, M.S., DeRemee, R.A., and Gross, W.L. Anticytoplasmic Autoantibodies: Their Immunodiagnostic Value in Wegener Granulomatosis. *Ann. Int. Med.* 111:28-40, 1989.
9. Falk, R.J., Jennette, J.C. ANCA Small-Vessel Vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8:314-322, 1997.
10. Dados em arquivo, Immuno Concepts, N.A., Ltd.

Em caso de dano na embalagem protetora, entre em contato com a Immuno Concepts antes de usar.



Fabricante



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Limitação de temperatura



Contém o suficiente para <n> testes



Consultar Instruções de uso



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
Assistência Técnica EUA: 1.800.251.5115 Fora dos EUA: 1.916.363.2649
Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

PROCEDIMENTO DO TESTE RELISA® PARA ANCA-PR3

Todas as amostras, reagentes (inclusive a solução tampão de lavagem) e os micropoços devem estar em temperatura ambiente antes do uso.

1. PREPARAÇÃO DA PLANILHA

Etiquetar a planilha incluída no kit para indicar a localização das amostras nos micropoços. Testar os padrões em duplicata. Para usar a curva de múltiplos pontos, os cinco soros padrões devem ser executados. Para o método de calibração de ponto simples opcional, executar apenas o Padrão nº 3 em duplicata. Um poço é usado para um branco de reagente. Recomendamos que cada amostra de controle e de paciente seja testada em duplicata até que uma precisão aceitável para o ensaio seja estabelecida em seu laboratório.

2. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO DE LAVAGEM (PBS-Tween)

Dissolver o conteúdo de uma bolsa de tampão PBS em um litro de água desionizada ou destilada. Adicionar todo o conteúdo de um frasco de Concentrado de tampão de lavagem a um recipiente de um litro de PBS dissolvido. Misturar bem. A solução tampão de lavagem pode ser tampada e armazenada de 2 °C a 25 °C por até quatro semanas.

3. DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DO PACIENTE

Diluir as amostras do paciente até 1:40 adicionando 25 µl de soro a 975 µl do diluente da amostra. Para usar o controle positivo para PR3 não diluído testado, diluí-lo da mesma forma que as amostras do paciente. Misturar bem. O soro calibrador, o controle positivo e o controle negativo são fornecidos na diluição de trabalho e não requerem mais diluição.

4. PREPARAÇÃO DOS MICROPOÇOS

Remover o número necessário de tiras de micropoços da bolsa e colocá-las no suporte. Os micropoços devem ficar firmemente assentados nesse suporte. Pressionar firmemente os dois lados das tiras, de modo que elas encaixem com segurança no suporte. Ao usar poços individuais ou menos que uma tira completa de poços, certificar-se que cada poço esteja firmemente assentado. Os poços adequadamente assentados não caem quando o suporte é invertido. Se forem necessários menos de oito poços para o teste, os poços podem ser destacados. Os poços não usados podem ser recolocados na bolsa de papel alumínio, vedada com o fecho tipo zíper e refrigerados por até 45 dias.

5. DISPENSAÇÃO DE DILUIÇÕES DE SORO

Dispensar 100 µl dos calibradores, controles e amostras diluídas do paciente nos poços apropriados como indicado na planilha. Dispensar 100 µl de diluente da amostra no poço de branco do reagente.

6. INCUBAR LÂMINAS (30 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 25 °C)

Incubar em temperatura ambiente por 30 minutos. As tiras devem ser protegidas de correntes de ar ou mudanças de temperatura durante a incubação. Caso se deseje, as tiras podem ser cobertas com fita transparente ou com papel-toalha para protegê-las de poeira e outros corpos estranhos.

7. LAVAGEM DAS TIRAS (Ver Notas de Procedimentos Gerais 5 e 6)

Lavar os poços 3 a 5 vezes com solução tampão PBS-Tween de lavagem. Na lavagem manual, aspirar o conteúdo dos poços e, a seguir, encher cada poço com solução tampão de lavagem. Evitar a contaminação cruzada dos poços, em especial na primeira lavagem depois da aspiração. Drenar todo o tampão de lavagem dos poços invertendo-os e impelindo o tampão de lavagem residual para fora dos poços com movimento enérgico do punho. Repetir as etapas de enchimento e drenagem até um total de 3 a 5

lavagens. Os poços devem ser batidos vigorosamente sobre papel-toalha ou material absorvente para remover todos os traços de tampão de lavagem residual.

8. DISPENSAÇÃO DO REAGENTE DE ANTICORPO ENZIMÁTICO

Dispensar 100 µl de reagente de anticorpo enzimático em cada um dos poços.

9. INCUBAR LÂMINAS (30 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 25 °C)

Incubar em temperatura ambiente por 30 minutos. As tiras devem ser protegidas de correntes de ar ou mudanças de temperatura durante a incubação. Caso se deseje, as tiras podem ser cobertas com fita transparente ou com papel-toalha para protegê-las de poeira e outros corpos estranhos.

10. LAVAGEM DAS TIRAS

Lavar os poços 3 a 5 vezes com solução tampão PBS-Tween de lavagem. Na lavagem manual, aspirar o conteúdo dos poços e, a seguir, encher cada poço com solução tampão de lavagem. Evitar a contaminação cruzada dos poços, em especial na primeira lavagem depois da aspiração. Drenar todo o tampão de lavagem dos poços invertendo-os e impelindo o tampão de lavagem residual para fora dos poços com movimento enérgico do punho. Repetir as etapas de enchimento e drenagem até um total de 3 a 5 lavagens. Os poços devem ser batidos vigorosamente sobre papel-toalha ou material absorvente para remover todos os traços de tampão de lavagem residual.

11. DISPENSAÇÃO DE SOLUÇÃO DE SUBSTRATO

Usando um temporizador para garantir intervalos iguais, dispensar 100 µl de solução de substrato a cada um dos poços. A solução de substrato deve ser adicionada aos poços em velocidade constante, de modo que cada um deles seja incubado exatamente pela mesma extensão de tempo (15 minutos). A solução de substrato nos poços incubados com amostras positivas fica azul e a solução nos poços incubados com amostras negativas serão incolores a azul muito claro.

12. INCUBAR LÂMINAS (Exatamente 15 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 25 °C)

Incubar em temperatura ambiente por exatamente 15 minutos. As tiras devem ser protegidas de correntes de ar ou mudanças de temperatura durante a incubação.

13. DISPENSAÇÃO DO REAGENTE DE PARADA

Depois que o primeiro poço for incubado por exatamente 15 minutos, adicionar 100 µl de reagente de parada a cada poço, na mesma ordem e na mesma velocidade que a solução de substrato foi adicionada aos poços. À adição do reagente de parada, a solução de substrato azul fica amarela e a solução incolor permanece incolor.

14. LEITURA DA ABSORBÂNCIA DOS POÇOS

Dentro de 30 minutos depois da adição do reagente de parada, os poços podem ser lidos em um espectrofotômetro de leitura de placa. Os poços são lidos em 450 nm contra o poço de branco de controle. Ao se usar espectrofotômetro de comprimento de onda duplo, o comprimento de onda para o filtro de referência deve ser definido em 600-650 nm. A leitura dos micropoços em 450 nm sem filtro de referência resultará em valores de absorbância maiores.

PARA ASSISTÊNCIA TÉCNICA:

EUA: 1-800-251-5115 Fora dos EUA: 1-916-363-2649

Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

