



## **TESTE MULTIPARAMÉTRICO RELISA<sup>®</sup> DE TRIAGEM DE ANTICORPO ENA Sm RNP SSA/Ro SSB/La Scl-70 Jo-1**

**Para uso em diagnóstico in vitro**

**Para uso profissional**

**Números de Catálogo: 7096-09 (96 poços) e 7696-09 (576 poços)**

*USO PRETENDIDO: Este é um sistema de imunoenensaio enzimático (EIA) para detecção de anticorpos para os antígenos nucleares extraíveis Sm (Smith), RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 e Jo-1 em soro humano. Os resultados desse ensaio podem ser usados como auxiliares no diagnóstico de doenças autoimunes.*

### **RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE**

Os anticorpos para antígenos nucleares extraíveis (ENA) foram associados a várias síndromes autoimunes e parecem ter significância diagnóstica e/ou prognóstica em esclerose sistêmica (1, 2), doença mista do tecido conectivo (3-5), síndrome de Sjögren (6, 7), polimiosite (8), dermatomiosite (9), lúpus eritematoso sistêmico (5) e artrite reumatoide (10). O teste de anticorpo antinuclear (ANA) foi usado como triagem para esses anticorpos, mas o ANA não indica a especificidade do anticorpo, e os anticorpos para alguns ENA não produzem teste ANA positivo (11, 12). Assim, os testes confirmatórios secundários para anticorpos para ENA são altamente recomendados (13).

O antígeno Sm (Smith) foi identificado em 1966, por Tan e Kunkel, como uma glicoproteína não-histona solúvel em solução salina, que não é dependente de DNA ou RNA para sua antigenicidade (14). Os anticorpos para o antígeno Sm são considerados um marcador sorológico específico, devido ao alto grau de especificidade para o lúpus eritematoso sistêmico (LES). Esses anticorpos encontrados em até 30% dos pacientes com LES e foram associados a doença renal ativa e cerebrite (15-17).

Os anticorpos para o antígeno Sm são encontrados com frequência em conjunto com anticorpos para U1-RNP no soro de pacientes com LES (18, 19). Ao contrário dos anticorpos para o antígeno Sm, os anticorpos para RNP não são considerados um marcador sorológico específico, porque são encontrados em pacientes com diversas doenças reumáticas, inclusive LES, esclerodermia, síndrome de Sjögren e artrite reumatoide. Contudo, os altos níveis de anticorpo anti-RNP são grandemente associados a uma síndrome de sobreposição chamada doença mista do tecido conectivo (DMTC). Os pacientes com DMTC são caracterizados por uma combinação de atributos clínicos encontrados em LES, esclerodermia e polimiosite. Esses pacientes apresentam, com frequência, boa resposta ao tratamento com corticosteroides e têm incidência menor de doença renal em comparação com os pacientes com LES (20, 21).

SSA e SSB foram descritos originalmente como antígenos nucleares da proteína-RNA em pacientes com síndrome de Sjögren (6, 7). Ro e La foram descritos como antígenos citoplasmáticos da proteína-RNA em pacientes com LES (22, 23). Agora, é amplamente aceito que SSA e Ro são análogos, SSB e La são análogo, e esses antígenos são encontrados no núcleo e no citoplasma. Os anticorpos para SSA/Ro sozinhos ou para SSA/Ro e SSB/La são encontrados em até 62% dos pacientes com lúpus cutâneo subagudo (24) e em 85% dos pacientes com síndrome de Sjögren que desenvolvem vasculite (25). Os anticorpos para SSA/Ro sozinho ocorrem em pacientes que têm deficiência homocigótica da fração C2 do complemento (26), em pacientes com cirrose biliar primária que desenvolvem síndrome de Sjögren (27), e em até dois terços de pacientes com "LES negativo para ANA" (28).

O auto-antígeno SSA/Ro é um complexo composto pelas proteínas Ro60 e Ro52 e com pequenas ribonucleoproteínas. Este complexo é por vezes denominado "complexo SSA/Ro hY-RNA", e também inclui a proteína SSB/La. A proteína Ro-60 está fortemente associada com o complexo SSA/Ro hY-RNA, mas a proteína Ro-52 está fracamente associada com este complexo (29).

O antígeno Scl-70 foi identificado como uma enzima celular, a DNA topoisomerase I (30). Os anticorpos para Scl-70 foram relatados em até 56% dos pacientes com esclerose sistêmica progressiva (ESP), em especial o subgrupo de pacientes com esclerodermia difusa (31). Esses autoanticorpos são considerados marcadores de ESP, porque eles não são vistos em outras doenças de tecido conectivo.

Os anticorpos para Jo-1, que é a enzima celular histidil tRNA sintetase, são encontrados em 25% a 30% dos pacientes com polimiosite ou dermatomiosite, mas não em outras miopatias (11, 32). Também se demonstrou que os anticorpos anti-Jo-1 têm alta associação com doença pulmonar intersticial vista em conjunto com miosite (32).

## PRINCÍPIO DO TESTE

Este teste é um EIA indireto qualitativo. As preparações estabilizadas de antígenos nucleares extraíveis purificados por afinidade foram usadas 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 humana de cadeias pesada e leve.

Depois da incubação com o conjugado HRP, se os resultados forem positivos, forma-se um complexo estável de três partes. Este complexo consiste no anticorpo anti-humano conjugado com HRP ligado ao anticorpo anti-ENA humano, 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-ENA 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 revestidos com antígeno nuclear extraível [PLATE]:** Número de Catálogo 7008-09. Um suporte de micropoços com 12 tiras de 8 poços revestidos de solução estabilizada de antígenos nucleares extraíveis purificados por afinidade. Uma tira de oito poços é usada para cada amostra de controle ou do paciente. 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 refrigeradas por até 45 dias.

**Diluyente da amostra [SOLN|DIL]:** Número de Catálogo 7015 (14 ml). Diluyente tamponado de amostra patenteado para diluir amostras de pacientes.

**Reagente para anticorpo enzimático - IgG humana específica para cadeia pesada e leve [CONJ|HRP]:** Número de Catálogo 7009-09 (14 ml). IgG anti-humana (coração e pulmão) conjugada a *horseradish* peroxidase (HRP). O reagente vem pronto para usar.

**Solução de substrato [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. **ATENÇÃO:** Inflamável. Este reagente contém menos de 25% de metanol e acetona. Mantenha fora do alcance de crianças. Em caso de contato com os olhos, lavar imediatamente e abundantemente com água e consultar um médico.

**Reagente de parada [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. **PERIGO:** Corrosivo. Esse reagente contém ácido clorídrico e ácido sulfúrico e deve ser manuseado 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.

**Controle positivo multiparamétrico para ENA [CONTROL| + ]:** Número de Catálogo 7021-09 (2 ml). Soro de controle humano positivo que contém anticorpos para os antígenos Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 e Jo-1. Este soro está na diluição de trabalho e é pronto para usar.

**Soro de controle negativo para ENA [CONTROL| - ]:** Número de Catálogo 7031 (2 ml). Soro de controle humano negativo que não contém anticorpos para Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 ou Jo-1. Este soro está na diluição de trabalho e pronto para usar.

## 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

Pipetador multicanais capaz 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 nos soros de controle. 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 pode 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 30 minutos para cada poço. Todas as amostras e reagentes devem ser dispensados na mesma sequência e em velocidade constante.

## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

### CONTROLE DE QUALIDADE

1. O poço de controle de solução de branco deve ter absorvância inferior a 250. Os valores de absorvância da solução de branco superiores a 250 indicam lavagem inadequada ou contaminação dos reagentes.
2. A leitura de absorvância do poço de controle de branco (fila A) é subtraído das leituras de absorvância poço de Procedimento de Verificação RELISA<sup>®</sup> (RPC) (fila B) e de cada um dos poços dos antígenos (filas C a H). Os valores líquidos inferiores a zero são considerados valores zero.
3. O poço de Procedimento de Verificação RELISA<sup>®</sup> (RPC) (fila B) deve ter absorvância líquida maior de 0,300. Os valores de absorvância inferior a 300 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.
4. Cada valor de absorvância líquida é multiplicado por 100 para obter o valor para cada antígeno em unidades de ENA.
5. O soro de controle positivo é uma mistura de soro humano que contém anticorpos para todos os seis antígenos neste teste. Cada poço de antígeno deve mostrar um valor de 30 unidades de ENA ou mais.
6. O soro de controle negativo é uma mistura de soro humano que não contém anticorpos para nenhum dos seis autoantígenos neste teste. Cada poço de antígeno deve mostrar um valor de menos de 20 unidades ENA.
7. Cada laboratório deve estabelecer a frequência de execução de soros de controle positivos e negativos, com base na frequência de testes de pacientes e na experiência do laboratório com este ensaio.

### INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO PACIENTE

1. Este é um ensaio qualitativo. Os níveis de anticorpos detectados não têm significância clínica conhecida, e 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 superiores a 30 unidades de ENA são considerados positivos. Os poços de amostra do paciente que têm valores calculados inferiores a 20 unidades de ENA são considerados negativos. Os valores entre 20 unidades e 30 unidades são considerados positivos limítrofes e devem ser repetidos. 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).
2. Os poços de Sm e Sm/RNP são usados em conjunto para determinar a presença desses dois autoanticorpos. Se o poço de Sm/RNP for positivo e o poço de Sm for negativo, o paciente tem anticorpos anti-RNP. Se ambos os poços forem positivos, com valores aproximadamente iguais, o paciente tem anticorpo para Sm. Se ambos os poços forem positivos, e o poço de Sm/RNP for 30 unidades de ENA ou mais superior ao poço de Sm, é indicativo da presença de autoanticorpos anti-Sm e anti-RNP. Se os poços de Sm e Sm/RNP estiverem em sua absorvância máxima ou próximo dela, pode haver perda de discriminação entre o poço de Sm e o de Sm/RNP. Nesse caso, a presença ou ausência de anticorpos anti-RNP não pode mais ser determinada com precisão pela subtração do valor de Sm do valor de Sm/RNP. A presença de ambos os anticorpos pode ser confirmada usando-se o Sistema de imunodifusão AUTO-ID<sup>®</sup> da Immuno Concepts, número de catálogo 6030
3. Os outros poços são revestidos com antígenos monoespecíficos purificados por afinidade e reagem apenas com o anticorpo homólogo. Contudo, os soros de pacientes com especificidade múltipla para anticorpo são observados com frequência no LES e em outras síndromes autoimunes, de modo que cada soro pode apresentar uma reação positiva em mais de um poço.



4. Os poços são revestidos com antígenos purificados por afinidade na seguinte ordem, de cima (poço A, e a aba sólida terminal da tira) para baixo (poço H, e a aba endentada do final da tira):

**Poço A** – Controle de branco  
**Poço B** – Procedimento de Verificação RELISA® (RPC)  
**Poço C** – Sm  
**Poço D** – Sm/RNP  
**Poço E** – SSA/Ro (Ro60 and Ro52)  
**Poço F** – SSB/La  
**Poço G** – Scl-70  
**Poço H** – Jo-1

## LAUDO DE RESULTADOS

Os resultados devem ser relatados como positivos ou negativos para os anticorpos correspondentes aos antígenos nucleares extraíveis. Os níveis de anticorpos detectados não têm significância clínica conhecida.

## VALORES ESPERADOS

A incidência de autoanticorpos para vários antígenos nucleares varia, dependendo da população de pacientes e da incidência de doenças reumáticas clínicas nessa população. A associação de anticorpos com doenças reumáticas específicas está resumida na Tabela 1.

**Tabela 1**

| <b>Anticorpos para:</b> | <b>Associação com doenças:</b>   |
|-------------------------|--|
| Sm                      | Anticorpo marcador altamente específico, visto em 25% a 30% dos pacientes com LES                                      |
| U1-RNP                  | Doença mista do tecido conectivo > 95%; LES 35%; menor frequência em lúpus discoide ou esclerose sistêmica progressiva |
| SSA/Ro                  | Síndrome de Sjögren 60-70%; LES 50%  |
| SSB/La                  | Síndrome de Sjögren 40-50%; LES 15%  |
| Scl-70                  | Anticorpo marcador altamente específico visto em 15% a 20% dos pacientes com ESP                                       |
| Jo-1                    | Anticorpo marcador altamente específico visto em 25% a 30% dos pacientes com polimiosite ou dermatomiosite             |

## FAIXA DE REFERÊNCIA

A faixa de referência foi estabelecida testando-se soros de 206 doadores de sangue saudáveis, 105 mulheres e 101 homens, nenhum dos quais tinha história conhecida de doenças reumáticas. Além disso, foram obtidos dados de 143 pacientes com doença reumática que tinham anticorpos para um ou mais dos antígenos deste ensaio, mas eram negativos para anticorpos para outros antígenos. Com base nesses dados, os valores de corte normais foram estabelecidos como inferiores a 20 unidades de ENA. As Boas Práticas de Laboratório ditam que cada laboratório deve estabelecer suas próprias faixas de normalidade com base em sua população de pacientes e em outros fatores locais.

## LIMITAÇÕES DO TESTE

1. O diagnóstico não pode ser feito com base apenas em anticorpos para antígenos nucleares extraíveis. 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 para antígenos nucleares extraíveis. As indicações clínicas, outros achados laboratoriais e a impressão clínica do médico devem ser considerados antes de iniciar qualquer tratamento.
3. Alguns pacientes com doenças autoimunes podem ter níveis não-detectáveis ou insignificantes de anticorpos para antígenos nucleares extraíveis, e alguns indivíduos podem ter níveis altos de anticorpos para antígenos nucleares extraíveis, mas com pouca ou nenhuma evidência de doença clínica. O médico precisa interpretar os resultados de testes para anticorpos para antígenos nucleares extraíveis em conjunto com a história e os sintomas do paciente, seus achados físicos e outros procedimentos diagnósticos.
4. Os níveis de anticorpos detectados com esse sistema de teste não necessariamente indicam gravidade ou duração da doença.

# CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O Ensaio de Triagem RELISA<sup>®</sup> da Immuno Concepts foi comparado com outros ensaios ELISA similares encontrados no comércio, a testes de imunodifusão dupla e contra-imunoeletroforese realizados em laboratórios de referência e a resultados de *immunoblotting* (Western Blot) obtidos com um método doméstico. Os resultados de todos os métodos e os diagnósticos clínicos do paciente foram considerados na determinação dos resultados esperados ou “corretos” para cada amostra testada. Com base nessas comparações, foram obtidos os dados da Tabela 2.

**Tabela 2**

| Anticorpos para: | Sensibilidade relativa | Especificidade relativa | Equivalência geral |
|------------------|------------------------|-------------------------|--------------------|
| Sm               | 97,0%                  | 95,5%                   | 95,8%              |
| Sm/RNP           | 94,8%                  | 94,1%                   | 94,4%              |
| SSA/Ro           | 100%                   | 83,3%                   | 96,5%              |
| SSB/La           | 100%                   | 95,9%                   | 97,9%              |
| Scl-70           | 100%                   | 100%                    | 100%               |
| Jo-1             | 100%                   | 100%                    | 100%               |

As discrepâncias na especificidade são atribuídas à maior sensibilidade dos ensaios ELISA em comparação com os métodos “tradicionais”, como contra-imunoeletroforese (CIE) e imunodifusão.

## REATIVIDADE CRUZADA

Sete amostras foram usadas para os estudos de reatividade cruzada. Essas amostras foram bem caracterizadas por Western Blot, CIE e imunodifusão como soros monoespecíficos para cada um dos autoanticorpos do Teste de triagem RELISA<sup>®</sup>. Não se observou reatividade cruzada em nenhuma dessas amostras. Ver Tabela 3.

**Tabela 3**

| Amostra     | Antígeno |        |        |        |        |      |
|-------------|----------|--------|--------|--------|--------|------|
|             | Sm       | Sm/RNP | SSA/Ro | SSB/La | Scl-70 | Jo-1 |
| Anti-Sm     | POS      | POS    | NEG    | NEG    | NEG    | NEG  |
| Anti-RNP    | NEG      | POS    | NEG    | NEG    | NEG    | NEG  |
| Anti-Sm/RNP | POS      | POS    | NEG    | NEG    | NEG    | NEG  |
| Anti-SSA/Ro | NEG      | NEG    | POS    | NEG    | NEG    | NEG  |
| Anti-SSB/La | NEG      | NEG    | NEG    | POS    | NEG    | NEG  |
| Anti-Scl-70 | NEG      | NEG    | NEG    | NEG    | POS    | NEG  |
| Anti-Jo-1   | NEG      | NEG    | NEG    | NEG    | NEG    | POS  |

## REPRODUTIBILIDADE

Para cada uma das seis especificidades antigênicas, seis amostras foram executadas em três diferentes números de lote de tiras de antígeno, em três ocasiões distintas. Duas das amostras foram negativas, mas próximas do valor de corte de 20 unidades de ENA; duas amostras foram positivas, mas próximas do valor de corte de 20 unidades de ENA e duas amostras foram claramente positivas acima do nível de 30 unidades de ENA. Em nenhum caso uma amostra negativa mostrou resultados positivos; todos os positivos “limítrofes” deram resultados entre 20 e 30 unidades de ENA; e as amostras claramente positivas deram, de maneira sistemática, resultados claramente positivos.

# BIBLIOGRAFIA

1. Douvas, A.S., Achten, M., and Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Scl-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *J. Biol. Chem.* 254:10514-10522, 1979.
2. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M.J., et al. Autoantibodies to Centromere (Kinetochores) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1627-1631, 1980.
3. Cohen, M.L., Dawkins, B., Dawkins, R.L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
4. Sharp, G.C., Irwin, W.S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease-An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52:148-159, 1972.
5. Sharp, G.C., Irwin, W.S., May, L.M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm Antigens with mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus, and Other Rheumatic Diseases. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154, 1976.
6. Alspaugh, M.A., and Tan, E.M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1078, 1975.
7. Alspaugh, M.A., Talal, N., and Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
8. Wolfe, J.F., Adelstein, J.F., and Sharp, G.C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
9. Nishikai, M. and Reichlin, M. Purification and Characterization of a Nuclear Non-histone Basic Protein (Mi-1) which reacts with Anti-immunoglobulin Sera and the Sera of Patients with Dermatomyositis. *Mol. Immunol.* 17: 1129-1141, 1980.
10. Alspaugh, M.A., and Tan, E.M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration by Precipitation and Immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* 19:711-719, 1976.

11. Holden, D.J., Brownell, A.K.W., and Fritzier, M.J. Clinical and Serologic Features of Patients with Polymyositis or Dermatomyositis. *Can. Med. Assoc. J.* 132:649-653, 1985.
12. Hoy, E.S. Detection of Autoantibodies to the SSA/Ro Antigen: Comment on the Article by Boire et al (letter). *Arthritis Rheum.* 35:1109-1112, 1992.
13. Fritzier, M.J. and Tan, E.M. Antinuclear Antibodies and the Connective Tissue Diseases, p. 207-247. In Cohen, A.S. (ed.), *Laboratory Diagnostic Procedures in the Rheumatic Diseases* (Third Edition). Grune and Stratton, Orlando, FL, 1985.
14. Tan, E.M. and Kunkel, H.G. Characteristics of a Soluble Nuclear Antigen Precipitating with Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 96:464-471, 1966.
15. Winfield, J.B., Brunner, C.M., and Koffler, D. Serological Studies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Central Nervous System Dysfunction. *Arthritis Rheum.* 21:289-294, 1978.
16. Nakamura, R.M. and Tan, E.M. Autoantibodies to Nonhistone Nuclear Antigens and Their Clinical Significance. *Hum. Pathol.* 14:392-400, 1983.
17. Hamburger, M., Hodes, S., and Barland, P. The Incidence and Clinical Significance of Antibodies to Extractable Nuclear Antigens. *Am. J. Med. Sci.* 273:21-28, 1977.
18. Lerner, M.R. and Steitz, J.A. Antibodies to Small Nuclear RNAs Complexed with Proteins are Produced by Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5495-5499, 1979.
19. Conner, G.E., Nelson, D., Wisniewolski, R., et al. Protein Antigens of the RNA-protein Complexes Detected by Anti-Sm and Anti-RNP Antibodies Found in Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Related Disorders. *J. Exp. Med.* 156:1475-1485, 1982.
20. Notman, D.D., Kurata, N., and Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Intern. Med.* 83:464-469, 1975.
21. Tan, E.M. Antinuclear Antibodies in Diagnosis and Management. *Hosp. Pract.* 18:78-84, 1983.
22. Clark, G., Reichlin, M., and Tomasi, T.B. Characterization of a Soluble Cytoplasmic Antigen Reactive with Sera from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 102:117-122, 1969.
23. Mattioli, M. and Reichlin, M. Heterogeneity of RNA Protein Antigens Reactive with Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 17:421-429, 1974.
24. Sontheimer, R.D., Maddison, P.J., Reichlin, M., et al. Serologic and HLA Associations in Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus, a Clinical Subset of Lupus Erythematosus. *Ann. Intern. Med.* 97:664-671, 1982.
25. Alexander, E.L., Arnett, F.C., Provost, T.T., et al. Sjögren's Syndrome: Association of Anti-Ro (SSA/Ro) Antibodies with Vasculitis, Hematologic Abnormalities, and Serologic Hyperreactivity. *Ann. Intern. Med.* 98:155-159, 1983.
26. Provost, T.T., Arnett, F.C., and Reichlin, M. Homozygous C2 Deficiency, Lupus Erythematosus, and Anti-Ro (SSA/Ro) Antibodies. *Arthritis Rheum.* 26:1279-1282, 1983.
27. Wasicek, C.A. and Reichlin, M. Clinical and Serological Differences Between Systemic Lupus Erythematosus Patients with Antibodies to Ro versus Patients with Antibodies to Ro and La. *J. Clin. Invest.* 69:835-843, 1982.
28. Maddison, P.J., Provost, T.T., and Reichlin, M. Serological Findings in Patients with "ANA Negative" Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine* 60:87-94, 1981.
29. Conrad, K., ed., *Autoantibodies in Systemic Autoimmune Disease – A Diagnostic Reference*, 2nd edition, Dresden, Pabst, 2007: 167-172.
30. Guldner, H.H., Szostecki, C., Vosberg, H.P., et al. Scl 70 Autoantibodies from Scleroderma Patients Recognize a 95 kDa Protein Identified as DNA Topoisomerase I. *Chromosoma* 94:132-138, 1986.
31. Jarzabek-Chorzelska, M., Blaszczyk, M., Jablonska, S., et al. Scl 70 Antibody-A Specific Marker of Systemic Sclerosis. *Brit. J. Dermatol.* 115:393-401, 1986.
32. Bernstein, R.M., Morgan, S.H., Chapman, J., et al. Anti-Jo-1 Antibody: A marker for Myositis with Interstitial Lung Disease. *Brit. Med. J.* 289:151-152, 1984.

**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. 9582 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](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

Cat 7096-09-I,

4.11.02.003.100-Pt

Rev 6.1

© Copyright 2015



# PROCEDIMENTO DO TESTE RELISA® PARA ENA

**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 identificação de cada tira de oito micropoços.
- 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. Misturar bem. Os controles são fornecidos na diluição de trabalho e não exigem mais diluição.
- 4. PREPARAÇÃO DAS TIRAS DE 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. Os poços adequadamente assentados não caem quando o suporte é invertido. As tiras não usadas podem ser recolocadas na bolsa de papel alumínio, vedada com o fecho tipo zíper e refrigeradas por até 45 dias.
- 5. DISPENSAÇÃO DE DILUIÇÕES DE SORO**  
Dispensar 100 µl de amostra diluída do paciente em cada um dos oito poços em uma tira multiparamétrica.
- 6. INCUBAR LÂMINAS** (30 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 25 °C)  
Incubar em temperatura ambiente por 30 minutos. Os poços devem ser protegidos de correntes de ar ou mudanças de temperatura durante a incubação. Caso se deseje, os poços podem ser cobertos 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 (30 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 30 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 25 °C)  
Incubar em temperatura ambiente por exatamente 30 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 30 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. Ler os micropoços 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](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

