

TESTE DE TRIAGEM RELISA® COM POÇO ÚNICO DE ENA PARA ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS NUCLEARES EXTRAÍVEIS

Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso profissional

Números de Catálogo: 7096-10 (96 poços) e 7696-10 (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 à 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 análogos, 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 ribonúcleoproteínas.

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, 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. Uma mistura de antígenos nucleares extraíveis estabilizados e purificados por afinidade foi usada 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 da 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, forma-se um complexo estável de três partes se os resultados forem positivos. 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 H₂O₂ 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 7008-10. Um suporte de micropoços com 12 tiras de 8 poços revestidos de uma mistura de sete antígenos nucleares extraíveis estabilizados e purificados por afinidade (Sm, RNP, SSA/Ro60, Ro52, SSB/La, Scl-70 e Jo-1). Essas tiras são codificadas na cor marrom. 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 refrigeradas por até 45 dias.

Diluinte da amostra **SOLN|DIL:** Número de Catálogo 7100 (100 ml). Diluinte 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 7009-10 (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 (H₂O₂). 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 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.

Soro calibrador para ENA **CAL**: Número de Catálogo 7026-10 (2 ml). Soro humano que contém anticorpos para um ou mais dos antígenos nucleares extraíveis Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 e/ou Jo-1. O valor do ensaio para este soro está declarado na etiqueta do frasco. Este soro está na diluição de trabalho e é pronto para usar.

Controle positivo para ENA **CONTROL|+**: Número de Catálogo 7021-10 (2 ml). Soro humano de controle positivo que contém anticorpos para um ou mais dos antígenos nucleares extraíveis Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 e/ou 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 os antígenos Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 ou Jo-1. Este soro está na diluição de trabalho e é pronto para usar.

Controle positivo não-diluído opcional para ENA **OPT+**: Número de Catálogo 7022-10 (0,25 ml). Soro humano de controle positivo que contém anticorpos para um ou mais dos antígenos nucleares extraíveis Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 e/ou Jo-1. Tratar este controle positivo como soro não diluído.

COMPONENTES NÃO-REATIVOS

Suporte para tiras de 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 multicanaís 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. Todos os soros de controle, soros calibradores e 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 azida sódica (0,09%) é usada como conservante nos soros de controle e calibrador. A azida sódica pode reagir com instalações hidráulicas de chumbo ou cobre e formar sais de azida metálica explosivos. Aos 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.
4. A diluição dos componentes ou a substituição dos componentes além dos fornecidos com o sistema podem gerar resultados inconsistentes.
5. Não aquecer as amostras de soro inativado que serão usadas para for RELISA® de triagem para ENA. Aquecer substâncias inativadas pode causar valores elevados.
6. Este kit destina-se ao uso para diagnóstico *in vitro*.
7. 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.
8. Não fumar, comer ou beber nas áreas em que as amostras ou reagentes do kit são manuseados.
9. Evitar respingos ou geração de aerossóis todas as vezes.
10. Os tempos e temperaturas de incubação além dos especificados podem gerar resultados errôneos.
11. A contaminação cruzada de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos. As amostras devem ficar confinadas aos micropoços durante o teste.
12. 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.
13. Deixar todos os reagentes, micropoços e amostras chegarem à temperatura ambiente (18°C a 25°C) antes de usar.
14. Usar luvas descartáveis ao manusear amostras e reagentes, e lavar completamente as mãos depois.
15. A contaminação microbiana de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos.
16. 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.

CUIDADO: Não aquecer as amostras de soro inativado que serão usadas para for RELISA® de triagem para ENA. Aquecer substâncias inativadas pode causar valores elevados.

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 o 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 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

CÁLCULOS

1. Subtrair o valor de absorbância para o poço de solução de branco dos valores de absorbância obtidos nos poços do soro calibrador, controle e da amostra do paciente. Calcular os valores de absorbância média para poços duplicados.
2. A concentração de anticorpo específico do soro calibrador (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:

$$\frac{U_c}{\lambda_c} \times \lambda_s = U_s$$

U_c = Valor do calibrador (unidades)

λ_c = Absorbância do calibrador*

λ_s = Absorbância da amostra*

U_s = Valor unitário da amostra

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

CONTROLE DE QUALIDADE

1. O valor de absorvância média dos poços calibradores deve ser pelo menos 0,400. Os valores de absorvância 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 absorvância inferior a 0,150. Os valores de absorvância da solução de branco superiores a 0,150 indicam lavagem inadequada ou contaminação dos reagentes.
3. As amostras com valores de anticorpos específicos maiores que o limite superior do calibrador devem ser relatadas como positivas com valor unitário "maior ou igual" ao valor da unidade declarado na etiqueta do soro calibrador.
4. O fator de conversão deve ser calculado para cada execução. Usar 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 para um ou mais dos antígenos nucleares extraíveis Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 e/ou Jo-1. Esse é um controle qualitativo, que deve produzir um resultado superior a 20 unidades de ENA.
7. O soro de controle negativo é uma mistura de soro humano que não contém anticorpos para nenhum dos seis autoantígenos neste teste. Esse é um controle qualitativo, que deve produzir um resultado superior a 20 unidades de ENA.
8. O soro de controle positivo não diluído é soro humano que contém anticorpos para um ou mais dos antígenos nucleares extraíveis Sm, RNP, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70 e/ou Jo-1. Este controle deve dar um valor maior do que 20 unidades de ENA.
9. Se algum valor de controle estiver fora da faixa, o ensaio é inválido e deve ser repetido.

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 maiores ou iguais a 25 unidades de ENA são considerados positivos, e devem ser testados para especificidades individuais para ENA. 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 25 unidades são considerados positivos limítrofes e devem ser repetidos ou testados para especificidades individuais para ENA. 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. Desde que o Teste de triagem RELISA[®] com poço único de ENA contém uma mistura de antígenos, os resultados representam um composto de reações contra anticorpos para cada um dos seis antígenos. Se os níveis baixos de múltiplos autoanticorpos estão presentes, o Teste de triagem RELISA[®] com poço único de ENA pode apresentar resultado positivo, mas as especificidades individuais podem estar abaixo dos valores de corte para cada um.

LAUDO DE RESULTADOS

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

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.

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

Anticorpos para:	Associação com doenças:
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 403 doadores de sangue saudáveis, 205 mulheres e 198 homens, nenhum dos quais tinha história conhecida de doenças reumáticas. 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.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O teste de triagem RELISA® com poço único de ENA da Immuno Concepts foi comparado com o Teste multiparamétrico de triagem RELISA® para ENA da Immuno Concepts. A população de pacientes estudados consistiu em 50 pacientes que satisfizeram os critérios para o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmicos, 25 pacientes com miosite autoimune ou síndromes de sobreposição de miosite, 23 pacientes com diagnóstico de esclerodermia ou esclerose sistêmica progressiva, 21 pacientes com síndrome de Sjögren, 3 pacientes com diagnóstico de artrite reumatoide, 18 pacientes com doença do tecido conectivo indiferenciada e 403 indivíduos sem doença autoimune conhecida. Com base nessa comparação, foram obtidos os seguintes dados: Tabela 2.

Immuno Concepts Poço simples RELISA® Triagem de ENA Teste	RELISA® da Immuno Concepts Teste multiparamétrico para triagem de ENA		
	Positivo	Limítrofe	Negativo
Positivo	126	9	5
Limítrofe	0	2	4
Negativo	1	2	394

Os resultados limítrofes foram considerados positivos. Esses dados geraram a seguinte estatística: sensibilidade relativa, 97,9%; especificidade relativa, 97,8% e equivalência geral, 97,8%.

REPRODUTIBILIDADE

Seis amostras positivas e cinco amostras negativas foram executadas em três números de lotes diferentes de tiras de antígeno, em três ocasiões distintas. Em nenhum caso uma amostra negativa apresentou resultados positivos, e as amostras positivas apresentaram resultados claramente positivos de maneira uniforme.

BIBLIOGRAFIA

1. Douvas, A.S., Achten, M., and Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-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). *52:148-159*, 1972.
5. Sharp, G.C., Irwin, W.S., Tan, E.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 Fritzler, 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. Fritzler, 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) 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) 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., Szostek, 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. 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 DE TRIAGEM RELISA® COM POÇO ÚNICO

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 o soro calibrador 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 se estabeleça uma precisão aceitável para o ensaio 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. Se estiver usando um controle positivo não diluído para ENA opcional, 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 (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. 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

