

TESTE RELISA® PARA ANTICORPO IgG e IgM ANTICARDIOLIPINA

Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso profissional

Números de Catálogo: 7096-02 (96 poços) e 7696-02 (576 poços)

USO PRETENDIDO: Este é um sistema de imunoensaio enzimático (EIA) para detecção e mensuração de anticorpos IgG e IgM anticardiolipina em soro humano. Este sistema de teste destina-se ao uso como auxiliar na avaliação de risco de transtornos trombóticos em indivíduos com lúpus eritematoso sistêmico ou síndromes do tipo lúpus.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Os anticorpos antifosfolípidos, inclusive os anticorpos anticardiolipina, são detectados com frequência em soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (1). Numerosos relatos associaram esses autoanticorpos com vários transtornos trombóticos venosos e arteriais, inclusive infarto cerebral (2), trombose venosa profunda (3), trombocitopenia (1), embolia pulmonar (4) e perda fetal recorrente com infarto de placenta (5). O “anticoagulante do lúpus” (6), substância que prolonga o teste in vitro de tromboplastina parcial ativada, também foi associado a essas síndromes clínicas, embora não seja idêntico ao anticorpo anticardiolipina. Os termos “anticoagulante do lúpus” e “anticorpos antifosfolípidos” são, às vezes, incorretamente usados um pelo outro, embora essas imunoglobulinas não sejam iguais (1).

O sistema de teste da Immuno Concepts é um imunoensaio enzimático em micropoços para detecção de anticorpos anticardiolipina em soro humano. Já se demonstrou que o imunoensaio de fase sólida é um método extremamente sensível e específico para detecção de anticorpos anticardiolipina (7-10). O sistema de teste da Immuno Concepts foi padronizado usando uma preparação de referência reconhecida internacionalmente, obtida do Antiphospholipid Standardization Laboratory (Laboratório de padronização de fosfolípidos), os “Padrões de Harris” (9). Os resultados objetivos obtidos nesse ensaio são relatados como unidades GPL para anticorpos IgG anticardiolipina, e como unidades MPL para anticorpos IgM anticardiolipina.

PRINCÍPIO DO TESTE

Esse teste é um EIA indireto. Uma preparação estabilizada de cardiolipina foi usada para revestir a superfície dos micropoços, visando servir como antígeno neste sistema. Soro, controles e amostras diluídas dos pacientes calibrados são colocados nos micropoços e incubados, permitindo que os anticorpos anticardiolipina 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 IgG ou IgM anti-humanos marcados com *horseradish* peroxidase. Duas preparações de anticorpos conjugados a *horseradish* peroxidase (conjugado HRP) são incluídas no sistema de teste. Uma delas é específica para a IgG humana e a outra, para IgM humana. As concentrações de anticorpos IgG anticardiolipina e anticorpos IgM anticardiolipina devem ser determinadas separadamente, usando-se esses dois conjugados.

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 anticardiolipina humano, que é ligado à cardiolipina estabilizada 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 anticardiolipina em cada amostra de soro. Cada micropoço é lido em um espectrofotômetro e os resultados são obtidos por comparação das absorvâncias dos poços do calibrador com as absorvâncias dos poços de amostra.

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 de cardioplipina **PLATE:** N° de Catálogo 7008-01. Um suporte para micropoços com 12 tiras de 8 poços revestidos de solução estabilizada de difosfatidilglicerol (cardiolipina) de coração de boi. 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.

Diluyente da amostra **SOLN|DIL:** Número do Catálogo 7100 (100 ml). Diluyente tamponado de amostra patenteado para diluir amostras de pacientes. Esse diluyente contém o cofator apolipoproteína H.

Controle positivo para anticorpo IgG anticardioplipina **CONTROL|+:** Número de Catálogo 7021-02G. Frasco contendo 1,5 ml de soro humano positivo de controle para anticardioplipina pronto para usar. Esse soro contém anticorpos IgG anticardioplipina. Ver as faixas GPL esperadas na etiqueta do frasco.

Controle positivo para anticorpo IgM anticardioplipina **CONTROL|+:** Número de Catálogo 7021-02M. Frasco contendo 1,5 ml de soro humano positivo de controle para anticardioplipina pronto para usar. Esse soro contém anticorpos IgM anticardioplipina. Ver as faixas MPL esperadas na etiqueta do frasco.

Controle negativo para anticorpo anticardioplipina **CONTROL|-:** Número de Catálogo 7031-01. Frasco contendo 2 ml de soro humano negativo de controle para anticardioplipina pronto para usar. Os valores esperados para GPL e MPL são inferiores a 5,0 unidades.

Calibrador para anticorpo IgG anticardioplipina **CAL:** Número de Catálogo 7026-02G. Frasco contendo 1,5 ml de soro calibrador humano líquido e estável positivo para IgG anticardioplipina. Ver a concentração de anticorpo anticardioplipina em unidades GPL na etiqueta do frasco.

Calibrador para anticorpo IgM anticardioplipina **CAL:** Número de Catálogo 7026-02M. Frasco contendo 1,5 ml de soro calibrador humano líquido e estável positivo para IgM anticardioplipina. Ver a concentração de anticorpo anticardioplipina em unidades MPL na etiqueta do frasco.

Reagente de anticorpo enzimático - Específico para IgG humana **CONJ|HRP:** Número de Catálogo 7009-02G (14 ml). IgG anti-humana conjugada a *horseradish* peroxidase (HRP). O reagente vem pronto para usar.

Reagente de anticorpo enzimático - Específico para IgM humana **CONJ|HRP:** Número de Catálogo 7009-02M (14 ml). IgM anti-humana 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) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O reagente vem pronto para usar. **PERIGO:** 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.

COMPONENTES NÃO-REATIVOS

Suporte para os micropoços

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.

Preparação: Dissolver uma bolsa de tampão em pó em um litro de água desionizada ou destilada, tampar e armazenar entre de 2 °C a 25 °C por até quatro semanas ou até que ocorram sinais de contaminação ou outras alterações visíveis. NÃO ADICIONAR TWEEN 20 OU OUTROS DETERGENTES A ESTE TAMPÃO.

MATERIAIS ADICIONAIS NECESSÁRIOS - PORÉM NÃO FORNECIDOS

Pipetadores de precisão volumétrica para dispensar volumes de 10-1000 µl
Almotolia para dispensar solução tampão de lavagem nos micropoços ou sistema de lavagem automática dos micropoços
Recipiente de um litro para 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 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 o teste de anticardiolipina. 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 em 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. A Immuno Concepts não recomenda o uso de plasma neste ensaio, devido à possibilidade de contaminação do plasma com plaquetas. As plaquetas podem afetar os resultados, devido à reação com anticorpos antifosfolípidos.

CAUIDADO: *Não aquecer as amostras de soro inativado que serão usadas para o teste de anticardiolipina. 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 freezer com autodescongelamento.

CAUIDADO: *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 se 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 podem 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 essa etapa por 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 vigorosamente 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.

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.
9. Não usar Tween 20, Triton X-100 ou outros detergentes nos tampões de lavagem nem em outros reagentes usados neste ensaio.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

CÁLCULOS

1. Subtrair o valor de absorbância para o poço de solução de branco de IgG dos valores de absorbância obtidos nos poços calibradores de IgG, controle e amostra do paciente. Subtrair o valor de absorbância para o poço de solução de branco de IgM dos valores de absorbância obtidos nos poços calibradores de IgM, controle e amostra do paciente. Calcular os valores de absorbância média para poços duplicados.
2. A concentração de anticorpo anticardiolipina do soro calibrador (declarado na etiqueta) é dividida pelo valor de absorbância média dos poços de calibrador para se obter o fator de conversão. São calculados fatores de conversão distintos para IgG e IgM.
3. Os valores de absorbância de cada uma das amostras são multiplicados pelo fator de conversão para se obter a concentração do anticorpo anticardiolipina em unidades GPL ou MPL.

CONTROLE DE QUALIDADE

1. O valor de absorbância média dos poços calibradores deve ser pelo menos 0,400.
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.
3. Os valores de anticorpo anticardiolipina obtidos em soros de controle positivos e negativos devem estar dentro das faixas indicadas nas etiquetas. Essas faixas foram estabelecidas de modo a abranger 95% dos valores esperados devido à variação estatisticamente normal. 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.
4. A significância clínica das concentrações de anticorpo anticardiolipina ainda está sendo investigada. As amostras com valores de anticorpos anticardiolipina 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.
5. O fator de conversão deve ser calculado para cada execução. Usar valor de conversão de outra execução ou fazer intercâmbio dos fatores de conversão GPL e MPL invalidará os resultados.
6. Cada laboratório deve estabelecer e manter seus próprios valores de referência (normal), com base na população de pacientes e em outros fatores locais. Ver exemplo em “Características de desempenho, especificidade clínica”.

VALORES ESPERADOS

FAIXA DE REFERÊNCIA

A significância clínica das concentrações de anticorpo anticardiolipina ainda está sendo investigada. Contudo, a maioria dos pesquisadores concorda que a significância clínica de encontrar baixas concentrações de anticorpos anticardiolipina não é conclusiva (17, 18).

Com base nos resultados de nossos testes (ver “Características de desempenho”), e na observação de que os pacientes com síndrome antifosfolípida em geral têm concentrações de altas a elevadas de anticorpos anticardiolipina (17), a Immuno Concepts recomenda as seguintes faixas de referência:

Alto nível = mais de 80 unidades GPL ou MPL
Nível moderado = 20 a 80 unidades GPL ou MPL
Nível normal = menos de 20 unidades GPL ou MPL

O Sistema de teste RELISA[®] para anticorpo IgG e IgM anticardiolipina também foi comparado aos anticorpos monoclonais Sapporo HCAL e EY2C9 do laboratório do Dr. Takao Koike. Essas amostras produziram valores próximos da média declarada para cada amostra. Essas amostras provaram ser instrumentos valiosos para estabelecer valores de unidades para o calibrador usado no ensaio RELISA[®].

Sugere-se que cada laboratório realize um estudo normal para estabelecer sua faixa de referência.

PREVALÊNCIA ESPERADA DE ANTICORPOS

Numerosos estudos demonstraram a associação de anticorpos anticardiolipina e lúpus eritematoso sistêmico (1, 7, 8, 11-16). Nesses estudos, a prevalência de anticorpos IgG anticardiolipina variou de 23% a 54% (média 41,4%), e a prevalência de anticorpos IgM anticardiolipina variou de 5% a 41% (média 25,5%). As diferenças na prevalência observada entre esses estudos provavelmente se devem a critérios de seleção de pacientes, às populações de pacientes estudadas ou às concentrações de anticorpos consideradas significantes. O Sistema de teste RELISA® para anticorpo anticardiolipina da Immuno Concepts foi usado para teste em amostras de soro de 58 pacientes atendidos em consulta reumatológica.

Essa população de pacientes foi selecionada devido às doenças reumáticas clínicas, mas não devido a qualquer estado patológico específico nem a história de trombose. Nessa população, 56 amostras (96,6%) foram negativas para anticorpos IgG anticardiolipina (27 amostras inferiores a 5 unidades GPL e 29 amostras na faixa de 5 a 20 unidades GPL), duas amostras (3,4%) tinham nível moderado de anticorpos IgG anticardiolipina, e nenhuma amostra tinha concentração alta de anticorpos IgG anticardiolipina. Uma amostra (1,7%) foi positiva para anticorpos IgM anticardiolipina em nível moderado.

LIMITAÇÕES DO TESTE

1. O diagnóstico não pode ser feito com base apenas nos títulos de anticorpo anticardiolipina. 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 anticardiolipina. As indicações clínicas, outros achados laboratoriais e a impressão clínica do médico devem ser considerados antes de iniciar qualquer tratamento.
3. Se o paciente for negativo para anticorpos anticardiolipina, mas os achados clínicos sugerirem a presença de anticorpos antifosfolídeos, alguns pesquisadores recomendam testar o anticoagulante do lúpus para confirmar os resultados negativos de anticardiolipina. Se os resultados para anticorpo anticardiolipina ou para anticoagulante do lúpus forem positivos, o paciente é considerado positivo para anticorpos antifosfolídeos (1).
4. Os pacientes com sorologia positiva para infecções sífilíticas podem apresentar resultado positivo para anticorpos anticardiolipina. Esses pacientes são considerados, em geral, sem maior risco de trombose, como se observa nos pacientes com doenças reumáticas com anticorpos anticardiolipina. Dezesete amostras de pacientes com sífilis confirmada, ativa ou com cicatriz sorológica (positiva para FTA-Abs e/ou MHA-TP) foram testadas no Sistema de teste RELISA® para anticorpo IgG e IgM anticardiolipina da Immuno Concepts. Doze (70,6%) dessas amostras eram positivas para anticorpos IgG anticardiolipina e três (17,6%) foram positivos para anticorpos IgM anticardiolipina, além dos anticorpos IgG. O diagnóstico de sífilis deve ser confirmado ou excluído por ensaios para anticorpo antitreponema.
5. Os anticorpos anticardiolipina podem ocorrer transitoriamente durante muitas infecções. Se um paciente tiver teste positivo enquanto existem sinais clínicos de infecção, o teste deve ser repetido depois que a infecção se resolver.
6. O fator reumatoide pode interferir com os ensaios de fase sólida para anticorpo IgM, levando a resultados falso-positivos.
7. Em estudos publicados sobre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, a prevalência de anticorpos IgG anticardiolipina variou de 23% a 54%, e a prevalência dos anticorpos IgM anticardiolipina foi relatada em 5% a 41% dos pacientes.
8. A significância clínica das concentrações de anticorpo anticardiolipina ainda está sendo investigada. Os níveis de anticorpos detectados com esse sistema de teste não necessariamente indicam gravidade ou duração da doença.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

ESPECIFICIDADE CLÍNICA

Controles normais: As amostras de soro de 330 doadores de sangue saudáveis foram testadas usando o Sistema de testes RELISA® para anticorpo anticardiolipina da Immuno Concepts. Nesse grupo de indivíduos, 327 (99,1%) eram negativos (246 amostras, menos de 5 unidades GPL e 81 amostras na faixa de 5 a 20 unidades GPL), 3 (0,9%) tiveram nível moderado de anticorpos IgG anticardiolipina, e nenhum teve altos níveis de anticorpos IgG anticardiolipina. Quando testados para IgM, 329 (99,7%) foram negativas (318 amostras menos de 5 unidades MPL e 11 amostras na faixa de 5 a 20 unidades MPL), uma (0,3%) teve nível moderado de anticorpos IgM anticardiolipina e nenhuma teve alto nível de anticorpos IgM anticardiolipina.

Controles de doença reumática: As amostras de soro de 20 pacientes com doenças reumáticas que não o LES, e sem história de episódios trombóticos, foram testadas no Sistema de teste RELISA® para anticorpos anticardiolipina da Immuno Concepts. Nenhuma dessas amostras foi positiva para anticorpos IgG ou IgM anticardiolipina.

SENSIBILIDADE CLÍNICA

O Sistema de teste RELISA® para anticorpo anticardiolipina da Immuno Concepts foi usado para teste amostra de soro de 58 pacientes atendidos em consulta reumatológica. Essa população de pacientes foi selecionada devido às doenças reumáticas clínicas, mas não devido a qualquer estado patológico específico nem a história de trombose.

Nessa população, 56 amostras (96,6%) foram negativas para anticorpos IgG anticardiolipina (27 inferiores a 5 unidades GPL e 29 amostras na faixa de 5 a 20 unidades GPL), duas amostras (3,4%) tinham nível moderado de anticorpos IgG anticardiolipina, e nenhuma amostra tinha concentração alta de anticorpos IgG anticardiolipina. Uma amostra (1,7%) foi positiva para anticorpos IgM anticardiolipina em nível moderado.

Essas mesmas amostras foram testadas pelo método anticardiolipina de referência por ELISA, que encontrou anticorpos IgG anticardiolipina nas mesmas duas amostras e anticorpos IgM anticardiolipina na mesma amostra isolada. Assim, o sistema da Immuno Concepts mostrou 100% de sensibilidade e 100% de especificidade tanto para anticorpos IgG quanto para IgM anticardiolipina, quando comparado com o método de referência.

As amostras de soro de 32 pacientes sem LES e história de pelo menos um episódio trombótico, foram testadas pelo Sistema de teste RELISA® para anticorpo anticardiolipina da Immuno Concepts. Sete dessas amostras tinham anticorpos anticardiolipina em nível moderado. Além dos anticorpos IgG anticardiolipina, uma amostra tinha anticorpos IgM anticardiolipina em nível moderado.

PRECISÃO

Oito amostras com valores conhecidos de anticorpos IgG anticardiolipina foram testadas, cada uma, em nove ocasiões diferentes. O coeficiente de variação (CV) entre ensaios variou de 6,4% a 10,4% (média 9,2%), e o CV entre ensaios para os valores GPL variou de 1,9% a 10,0% (média 8,7%).

Oito amostras com valores conhecidos de anticorpos IgM anticardiolipina foram testadas, cada uma, em nove ocasiões diferentes. O coeficiente de variação (CV) entre ensaios para os valores de absorbância dessas amostras variou de 8,0% a 10,0% (média 8,7%), e o CV entre ensaios para os valores MPL variou de 6,1% a 10,0% (média 7,7%).

Dois amostras sabidamente positivas para anticorpos IgG e duas para anticorpos IgM anticardiolipina foram testadas em dez replicações cada uma. Os resultados do coeficiente de variação (CV) intraensaio são mostrados na Tabela 1.

TABELA 1.

Amostra	Nível de anticardiolipina	CV intraensaio (absoluto)	CV intraensaio (unidades)
IgG positiva baixa	13 unidades GPL	2,4%	5,1%
IgG positiva moderada	70 unidades GPL	9,6%	7,1%
IgM positiva baixa	9 unidades MPL	5,0%	11,5%
IgM positiva moderada	25 unidades MPL	9,5%	7,0%

RECUPERAÇÃO

Dois amostras com níveis GPL conhecidos, um baixo e outro moderado, foram diluídas com partes iguais de solução padrão que continha quantidades conhecidas de anticorpos IgG anticardiolipina. Os dados observados e calculados são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2.

Amostra	GPL calculada	GPL observada	Recuperação (%)
Positiva baixa	-	9,0	-
Positiva baixa+10	10	11,0	110
Positiva baixa+20	14,5	14,3	99
Positiva baixa+40	24,5	25,3	103
Positiva baixa+60	34,5	35,7	103
Positiva moderada	-	54,0	-
Positiva moderada+10	32,0	32,3	101
Positiva moderada+20	37,0	38,1	103
Positiva moderada+40	47,0	46,4	99
Positiva moderada+60	57,0	57,7	101

Dois amostras com níveis MPL conhecidos, um baixo e outro moderado, foram diluídas com partes iguais de solução padrão que continha quantidades conhecidas de anticorpos IgM anticardiolipina. Os dados observados e calculados são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3.

Amostra	MPL calculada	MPL observada	Recuperação (%)
Positiva baixa	-	8,0	-
Positiva baixa+5	7,5	7,3	97
Positiva baixa+10	9,0	9,2	102
Positiva baixa+20	14,0	14,3	102
Positiva baixa+30	19,0	18,8	99
Positiva moderada	-	25,0	-
Positiva moderada+5	15,0	14,5	97
Positiva moderada+10	17,5	17,9	103
Positiva moderada+20	22,5	22,1	98
Positiva moderada+30	27,5	27,8	101

BIBLIOGRAFIA

- Harris, E.N., Gharavi, A.E., and Hughes, G.R.V. Anti-phospholipid Antibodies. Clin. Rheum. Dis. 11:591-609, 1985.
- Harris, E.N., Gharavi, A.E., Asherson, R.A., et al. Cerebral infarction in systemic lupus erythematosus: association with anticardiolipin antibodies. Clin. Exp. Rheumatol. 2:47-51, 1984.
- Mueh, J.R., Herbst, K.D., Rapaport, S.I. Thrombosis in patients with the lupus anticoagulant. Ann. Intern Med. 92:156-159, 1980.
- Anderson, N.E., Ali, M.R. The lupus anticoagulant, pulmonary thromboembolism and fatal pulmonary hypertension. Ann. Rheum. Dis. 43:760-763, 1984.
- Derue, G.J., Englert, H.J., Harris, E.N., et al. Fetal loss in systemic lupus erythematosus: association with anticardiolipin antibodies. J. Obstet. Gynaecol. 5:207-209, 1985.
- Boey, M.L., Colaço, C.B., Gharavi, A.E., Elkon, K.B., Loizou, S., and Hughes, G.R.V. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: striking association with the presence of circulating lupus anticoagulant. Brit. Med. J. 287:1021-1023, 1983.
- Harris, E.N., Gharavi, A.E., Boey, M.L., Patel, B.M., Mackworth-Young, C.G., Loizou, S., and Hughes, G.R.V. Anticardiolipin Antibodies: Detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus Erythema-tosus. Lancet ii:1211-1214, 1983.
- Loizou, S., McCrea, J.D., Rudge, A.C., Reynolds, R., Boyle, C.C., and Harris, E.N. Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. Clin. Exp. Lancet 62:738-745, 1985.
- Harris, E.N., Gharavi, A.E., and Hughes, G.R.V. Anticardiolipin antibody testing: the need for standardization. Arth. Rheum. 30:835-837, 1987.
- Harris, E.N. Solid-phase anticardiolipin test revisited. Am. J. Med. 85:599-601, 1988.
- Colaço, C.B., Male, D.K. Anti-phospholipid antibodies in syphilis and a thrombotic subset of SLE: distinct profiles of epitope specificity. Clin. Exp. Immunol. 59:449-456, 1985.
- McHugh, N.J., Maymo, J., Skinner, R.P., James, I., and Maddison, P.J. Anticardiolipin antibodies, livedo reticularis, and major cerebrovascular and renal disease in systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 47:110-115, 1988.
- Koike, T., Sueishi, M., Funaki, H., Tomioka, H., and Yoshida, S. Anti-phospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 56:193-199, 1984.
- Cronin, M.E., Biswas, R.M., Van der Straeten, C., Fleisher, T.A., and Klippel, J.H. IgG and IgM Anticardiolipin Antibodies in Patients with Lupus with anticardiolipin antibody associated clinical syndromes. J. Rheumatol. 15:795-798, 1988.
- Sturfelt, G., Nived, O., Norberg, R., Thorstensson, R., and Krook, K. Anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Arth. Rheum. 30:382-388, 1987.
- Ishii, Y., Nagasawa, K., Mayumi, T., and Niho, Y. Clinical importance of persistence of anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 49:387-390, 1990.
- Wilson, W. A., Gharavi, A.E., Koike, T., Lockshin, M.D., Branch, D.W., Piette, J.C., Brey, R., Derksen, R., Harris, E.N., Hughes, G.R., Triplett, D.A., and Khamashta, M.A. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. Arth. Rheum. 42:1309-1311, 1999.
- Miyakis, S., Lockshin, M.D., Atsumi, T., Branch, D.W., Brey, R.L., Cervera, R., Derksen, R.H.W.M., de Groot, P.G., Koike, T., Meroni, P.L., Reber, G., Shoenfeld, Y., Tincani, A., Vlachoyiannopoulos, P.G., Kritis, S.A. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J. Thromb. Haemost. 4:295-306, 2006.

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 ANTICORPO IGG E IGM ANTICARDIOLIPINA

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. Um poço é usado para amostra de branco de reagente para ensaios de IgG e um segundo poço é usado como branco de reagente para os ensaios de IgM. Recomendamos que cada amostra do paciente, calibrador e controle para anticorpos IgG e IgM anticardiolipina sejam testados em duplicada até que você estabeleça uma precisão aceitável para o ensaio em seu laboratório.

2. RECONSTITUIÇÃO DO TAMPÃO DE LAVAGEM (PBS)

Dissolver o conteúdo de uma bolsa de tampão em um litro de água desionizada ou destilada. O PBS pode ser tampado e armazenado de 2 °C a 25 °C por até quatro semanas.

3. DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DO PACIENTE

Diluir as amostras do paciente até 1:100 adicionando 10 µl de soro a 990 µl do diluente da amostra. Misturar bem. Os controles e calibradores são fornecidos na diluição de trabalho e não exigem 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 do paciente nos poços apropriados como indicado na planilha. Dispensar 100 µl de diluente da amostra no poço de branco do reagente.

6. INCUBAR MICROPOÇOS (30 ± 5 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-los de poeira e outros corpos estranhos.

7. LAVAGEM DOS MICROPOÇOS (Ver Notas de Procedimentos Gerais 5 e 6)

Lavar os poços 3 a 5 vezes com solução tampão PBS 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 essa etapa por 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

Dispense 100 µl de reagente de anticorpo enzimático anti-IgG a cada um dos poços correspondentes ao branco de IgG, calibrador

de GPL, controles de IgG e amostras de IgG do paciente. Dispensar 100 µl de reagente de anticorpo enzimático anti-IgM a cada um dos poços correspondentes ao branco de IgM, calibrador de MPL, controles de IgM e amostras de IgM do paciente.

9. INCUBAR MICROPOÇOS (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-los de poeira e outros corpos estranhos.

10. LAVAGEM DOS MICROPOÇOS

Lavar os poços 3 a 5 vezes com solução tampão PBS 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 essa etapa por 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 em 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 MICROPOÇOS (Exatamente 15 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 25 °C)

Incubar em temperatura ambiente por exatamente 15 minutos. Os poços devem ser protegidos 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 reagente. Ao se usar espectrofotômetro de comprimento de onda duplo, o comprimento de onda para o filtro de referência deve ser 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

