

SISTEMA DE TESTE RELISA® PARA TRIAGEM DE ANA

Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso profissional

Números de Catálogo: 7096-11 (96 poços) e 7696-11 (576 poços)

USO PRETENDIDO: Este é um sistema de imunoenensaio enzimático para detecção de anticorpos antinucleares em soro humano. Este sistema de teste deve ser usado como auxiliar na detecção de anticorpos associados com a doença reumática sistêmica.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Anticorpo antinuclear (ANA) é um termo geral usado para descrever autoanticorpos para várias proteínas nucleares das células. Estudos iniciais desses anticorpos, que empregaram técnicas de imunofluorescência, revelaram algumas especificidades selecionadas da proteína nuclear (1). Devido à alta correlação do ANA positivo com o lúpus eritematoso sistêmico (LES), o teste negativo para ANA essencialmente excluía a doença (2).

Embora os anticorpos específicos para DNA continuem a mostrar alta correlação com LES (3), várias das macromoléculas nucleares (4) e citoplasmáticas (5-7) também foram detectadas e associadas a outras doenças de tecido conectivo (8-10). Alguns desses anticorpos parecem ter significância diagnóstica e/ou prognóstica na esclerose sistêmica progressiva (11-12), na doença mista do tecido conectivo (13-15), síndrome de Sjögren (16-17), polimiosite (18), e/ou artrite reumatóide (19). Devido a essas associações com a patologia, o teste de ANA é, agora, reconhecido como um instrumento geral de triagem para a doença do tecido conectivo (20).

O método mais usado para testar ANA é o anticorpo fluorescente indireto (IFA) com células de cultura. A sensibilidade desses ensaios varia com o tipo de substrato usado, procedimento de fixação e tipos de ANA presentes nos soros. O teste IFA com células HEp-2 ou HEp-2000® é considerado sensível para a detecção de ANA; contudo, ele é trabalhoso e sujeito a erros devido à variabilidade dos microscópios fluorescentes e da interpretação humana.

Os imunoenensaio enzimáticos (EIA) são uma alternativa ao método IFA. Os sistemas de testes EIA podem triar com eficiência grandes números de amostras. Os erros humanos são reduzidos e os resultados são fornecidos de forma objetiva. Contudo, há relatos informando que os métodos EIA apresentam resultados falso-positivos e falso-negativos quando comparados com os métodos IFA (21).

PRINCÍPIO DO TESTE

Este teste é um EIA indireto qualitativo. Os antígenos estabilizados (dsDNA, histonas, SSA/Ro, SSB/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centrômeros, PCNA, Ribosomal P, M2 e outros antígenos extraídos do núcleo e citoplasma das células HEp-2) foram usados para revestir a superfície dos micropoços, visando servir como substrato antigênico nesse sistema. As amostras diluídas dos pacientes são colocadas nos micropoços e incubadas, permitindo que os anticorpos específicos da amostra reajam com o antígeno na fase sólida. Depois de lavagem para remover os anticorpos não-ligados e outras proteínas do soro, os poços são incubados com anticorpos anti-humanos de cabra marcados com *horseradish* peroxidase. A preparação de anticorpo conjugado a *horseradish* peroxidase que é incluída no sistema de teste é específica para IgG 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 antinuclear 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 antinucleares 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 RELISA® [PLATE]: Número de Catálogo 7008-11. Um suporte de micropoços com 12 tiras de oito poços revestidos com antígenos celulares (dsDNA, histonas, SSA/Ro, SSB/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, centrômero, PCNA, Ribosomal P, M2 e outros antígenos extraídos do núcleo e do citoplasma de células HEp-2). Essas tiras são codificadas na cor ameixa. Se forem necessários menos de oito poços para o teste, os poços podem ser destacados. As tiras não utilizadas podem ser recolocadas na bolsa de papel alumínio com a bolsa de agente dessecante, vedada com o fecho tipo zíper e refrigerada por até 45 dias.

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

Reagente para anticorpo enzimático RELISA® - IgG humana específica para cadeia pesada e leve [CONJ|HRP]: Número de Catálogo 7009-11 (14 ml). IgG anti-humana (coração e pulmão) conjugada a *horseradish* peroxidase (HRP). O reagente vem pronto para usar.

Solução de substrato RELISA® [SOLN|SUB]   : Número de Catálogo 7035 (14 ml). Solução de substrato enzimático específico para HRP, contendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) estabilizada e peróxido de hidrogênio (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 RELISA® [SOLN|STOP]   : Número de Catálogo 7033 (14 ml). Reagente de parada patenteado para sistemas de testes EIA da Immuno Concepts. O reagente vem pronto para usar. **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, enxágüe imediata e completamente com água e consulte um médico. Nunca adicione água a esse reagente.

Soro calibrador para ANA RELISA® [CAL]: Número de Catálogo 7026-11 (2 ml). Soro humano que contém anticorpos antinucleares. 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 ANA RELISA® [CONTROL|+]: Número de Catálogo 7021-11 (2 ml). Soro de controle humano positivo que contém anticorpos antinucleares. Este soro está na diluição de trabalho e é pronto para usar.

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

Controle positivo não-diluído opcional para ANA RELISA® [OPT+]: Número de Catálogo 7022-11 (0,25 ml). Soro de controle humano positivo que contém anticorpos antinucleares. Tratar este controle positivo como soro não diluído.

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

CÁLCULOS

1. Subtrair o valor de absorvância para o poço de solução de branco dos valores de absorvância obtidos nos poços do soro calibrador, controle e da amostra do paciente. Calcular os valores de absorvância média para poços duplicados.
2. A concentração de anticorpo específico do soro calibrador (declarada na etiqueta) é dividida pelo valor de absorvância média dos poços de calibrador para se obter o fator de conversão.
3. Os valores de absorvância 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:

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

U_c = Valor do calibrador (unidades)

λ_c = Absorvância do calibrador*

λ_s = Absorvância da amostra*

U_s = Valor unitário da amostra

*Se os calibradores e as amostras forem executados em duplicata, usar a absorvância 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 antinucleares. Esse é um controle qualitativo, que deve produzir um resultado superior a 15 unidades de ANA.
7. O soro de controle negativo é uma mistura de soro humano que não contém anticorpos antinucleares. Esse controle deve produzir um resultado inferior a 10 unidades de ANA.
8. O soro de controle e não diluído é soro humano que contém anticorpos antinucleares. Este controle devem dar um valor maior do que 15 unidades de ANA.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO PACIENTE

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 15 unidades de ANA são considerados positivos, devendo ser testados em lâmina com HEp-2 ou HEp-2000® para determinar os padrões de coloração do ANA, e com os testes pertinentes de acompanhamento. Os poços de amostra do paciente que têm valores calculados inferiores a 10 unidades de ANA são considerados negativos. Os valores entre 10 unidades e 15 unidades são considerados positivos limítrofes e devem ser repetidos, ou devem ser testados em lâminas com HEp-2 ou HEp-2000® para determinar os padrões de coloração do ANA, e com os testes pertinentes de acompanhamento. 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.)

LAUDO DE RESULTADOS

Os resultados devem ser relatados como positivos ou negativos para anticorpos antinucleares. Os níveis de anticorpos detectados não têm significância clínica conhecida.

LIMITAÇÕES DO TESTE

1. O diagnóstico pode ser feito com base apenas na detecção de anticorpo antinuclear. 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 antinucleares. As indicações clínicas, outros achados laboratoriais e a impressão clínica do médico devem ser considerados antes de iniciar qualquer tratamento.
3. Certas medicações, inclusive procainamida e hidralazina, podem induzir doença semelhante ao lúpus eritematoso sistêmico (22). Os pacientes com LE induzido por medicação podem ser positivos para ANA.
4. Embora o ANA de alto título possa ser bastante sugestivo de doença do tecido conectivo, não se pode considerá-lo diagnóstico, mas sim, visto como parte da história clínica geral de um paciente.
5. Os ANAs positivos também são vistos em uma pequena porcentagem de pacientes com doenças infecciosas e/ou neoplásicas (9).

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. Com a técnica imunofluorescente indireta com células HEp-2, foram detectados anticorpos antinucleares em 95% dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, 90% dos pacientes com lúpus induzido por medicamentos, 95% dos pacientes com doença mista do tecido conjuntivo, 80% dos pacientes com síndrome de Sjögren e 90% dos pacientes com esclerodermia (23).

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O Sistema de teste RELISA® para triagem de ANA da Immuno Concepts foi comparado com outro kit de teste de anticorpo antinuclear por ELISA, já encontrado no comércio. A população estudada consistiu em 579 amostras que foram enviadas a um grande centro médico universitário para testes de anticorpo antinuclear, sendo 90 amostras sabidamente positivas para ANA, 242 amostras de doadores de sangue do sexo feminino e 261 amostras de doadores de sangue do sexo masculino. Todas as amostras foram testadas em paralelo no dispositivo legalmente comercializado e o dispositivo proposto. Com base nessa comparação, foram obtidos os seguintes dados:

IC RELISA®	Dispositivo legalmente comercializado	
	Positivo	Negativo
Antinuclear	214	46
Anticorpo	12	105
Teste	8	787

Os resultados limítrofes foram considerados positivos. Esses dados mostram equivalência geral de 85,4%.

O grande número de amostras “falso-positivas” encontradas no teste da Immuno Concepts foi problemático, de modo que testamos todos esses soros quanto a anticorpos antinucleares usando o Sistema de teste HEp-2000® para ANA-Ro da Immuno Concepts. Demonstrou-se que setenta e nove das amostras “falso-positivas” têm padrões de ANA claramente discerníveis com a técnica anticorpo fluorescente indireto e elas foram consideradas “positivas verdadeiras” para a detecção de anticorpos antinucleares. Quatro das amostras “falso-negativas” pela técnica de anticorpo fluorescente indireto foram consideradas “negativas verdadeiras” para a detecção de anticorpos antinucleares. Assim, quando o método de referência é levado em consideração, a comparação assemelha-se ao seguinte:

IC RELISA®	Método de referência	
	Positivo	Negativo
Antinuclear	305	72
Anticorpo	4	791
Teste		

Esses dados mostram equivalência geral de 93,5%.

REPRODUTIBILIDADE

Nove amostras positivas, duas amostras limítrofes e cinco amostras negativas foram testadas em três números de lotes diferentes de tiras de micropoços revestidas com antígeno, em ocasiões diversas por vários técnicos. Em nenhum caso uma amostra negativa apresentou resultados positivos, e as amostras positivas apresentaram resultados claramente positivos de maneira uniforme. As amostras limítrofes variaram entre negativas e limítrofes.

BIBLIOGRAFIA

1. Robbins, W.C., Holman, H.R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:575-579, 1979.
2. Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. California Medicine 104:463-469, 1966.
3. Casals, Pt.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 7:379-390, 1964.
4. Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D. Ed. by H. Busch, pp. 457-477, New York, Academic Press, 1979.
5. Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 41:73-80, 1980.
6. Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. J. Immunol. 123:2673-2681, 1979.
7. Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Antiperinuclear Factor. 1. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. Ann. Rheum. Dis. 38:248-251, 1979.
8. Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. Hum. Pathol. 9:85-91, 1978.
9. Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. Semin. Arthritis Rheum. 6:83-124, 1976.
10. Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. J. Invest. Dermatol. 62:526-534, 1974.
11. Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. Biol. Chem. 245:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzier, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:1627-1631, 1980.
13. Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleo-protein. Ann. Rheum. Dis. 38:74-78, 1979.
14. Sharp, G. C., Irwin, W. Pt., 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.
15. Sharp, G. C., Irwin, W. Pt., May, L. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. N. Engl. J. Med. 295:1149-1154, 1976.
16. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. J. Clin. Invest. 55:1067-1073, 1975.
17. Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. Arthritis Rheum. 19:216-222, 1976.
18. Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. J. Clin. Invest. 59:176-178, 1977.
19. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration of Precipitation and Immunofluorescence. Arthritis Rheum. 19:711-719, 1976.
20. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
21. Emlen, W., O'Neill, L. Clinical Significance of Antinuclear Antibodies (ANA): Comparison of Detection with Immunofluorescence and Enzyme-linked Immunosorbent Assays. Arthritis Rheum. 40:1612-1618, 1997.
22. Lee, Pt.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. Arch. Int. Med 117:620-626, 1966.
23. von Mühlen, C.A., Tan, E.M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. Semin. Arthritis Rheum. 24:323-358, 1995.

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 ANA

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 ANA 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 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.

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 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.

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

