

AESKULISA[®] *THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS*

INSTRUCTION MANUAL

AESKULISA ANA-HEp-2

Ref 3115





Product Ref.	3115
Product Desc.	ANA-HEp-2
Manual Rev. No.	004 : 2014-03-12

Manual de Instruções

Conteúdo

1	Utilização	1
2	Aplicações clínicas e princípio do ensaio	1
3	Componentes do Kit	2
4	Armazenamento e validade	2
5	Avisos e medidas de precaução	3
6	Recolha da amostra, manipulação e armazenamento	4
7	Procedimento do teste	4
8	Interpretação Semiquantitativa.....	7
9	Dados Técnicos	8
10	Dados do teste / Características do teste.....	8
11	Bibliografia	9



1 Utilização

AESKULISA ANA-HEp-2 é um teste imunoenzimático em fase sólida, que permite a especificação qualitativa completa em soro humano de anticorpos da subclasse IgG contra células Hep2. Cada poço está revestido com células Hep2 lisadas. O teste detecta com cada poço Aa completo contra DNA de cadeia dupla (dsDNA), histonas, SS-A (Ro), SS-B (La), Sm, snRNP/Sm, Scl-70, Jo-1 e proteínas de centrômero como ainda soros que são positivos no teste de imunofluorescência (IFT) Hep2.

O teste serve para o diagnóstico diferencial de doenças reumáticas sistêmicas tais como lúpus eritematoso sistêmico (LES), doenças mistas do tecido conectivo, esclerodermia, Síndrome de Sjögren, polimiosite e dermatomiosite.

2 Aplicações clínicas e princípio do ensaio

Anticorpos anti-nucleares (AAN) estão dirigidos contra uma variedade de antígenos nucleares e citoplasmáticos e surgem com elevada frequência em doenças reumáticas sistêmicas. Por isso a sua detecção é um recurso importante para o diagnóstico diferencial. Assim, por exemplo, anticorpos SS-A (Ro) e SS-B (La) estão associados com LES e a Síndrome de Sjögren, anticorpos anti-DNA e anti-Sm com LES, anticorpos contra histonas com LES e lúpus induzido por medicamentos, anticorpos anti-RNP com doenças mistas do tecido conectivo e LES, anticorpos anti-Scl-70 com esclerodermia (esclerose sistêmica progressiva) anticorpos anti-Jo-1 com polimiosite e dermatomiosite e anticorpos contra proteínas de centrômero com a Síndrome de CREST.

Para a detecção de AAN o método usado até então era o teste indirecto de imunofluorescência (IFT) em células eucarióticas, como p. ex. células HeLa e Hep2. O IFT é certamente um método sensível, contudo é trabalhosos testar uma grande quantidade de soros. Além disso o sistema de teste pode estar sujeito a certos erros, devido à interpretação dos resultados do teste pelo pessoal do laboratório e às diferenças entre os microscópios de fluorescência. Daí que o sistema de teste ELISA oferece uma excelente alternativa ao IFT, para fazer o rastreio de soros de doentes quanto a AAN clinicamente relevantes.

A especificidade de AAN particulares pode ser determinada por meio de teste com ELISAs específicos, que usam os respectivos antígenos específicos. Isto permite uma diferenciação mais simples e fiável dos AAN segundo a sua especificidade.

Princípio do teste

As provas de soro, diluídas a 1:101, são incubadas nos poços que estão revestidas com o antígeno específico. Neste passo os anticorpos específicos do soro do doente, se presentes, unem-se ao antígeno na placa; partes de soro não ligadas são eliminadas na etapa de lavagem seguinte. Depois são adicionadas imunoglobulinas anti-humanas, que se encontram marcadas com peroxidase de rábano (conjugado). Durante uma incubação elas unem-se ao complexo antígeno-anticorpo previamente formado, e as imunoglobulinas não ligadas são eliminadas na etapa de lavagem seguinte. A prova de anticorpos ligados efectua-se através de uma reacção colorimétrica (azul) enzimática do substrato, que é parada com ácido diluído (mudança da cor para amarelo). A intensidade de cor do cromogénio depende da quantidade de conjugado ligado ao complexo antígeno-anticorpo, sendo dessa forma directamente proporcional à concentração inicial dos respectivos anticorpos na amostra do paciente.

3 Componentes do Kit

DILUIR ANTES DE USAR				
Item	Quantidade	Cor da tampa	Cor da solução	Descrição/Conteúdo
Tampão de amostra (5x)	1 x 20ml	Branco	Amarelo	concentrado 5x Tris, cloreto de sódio (NaCl), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Tampão de lavagem (50x)	1 X 20ml	Branco	Verde	concentrado 50x Tris, NaCl, Tween 20, azido de sódio < 0.1% (conservante)
PRONTO A USAR				
Item	Quantidade	Cor da tampa	Cor da solução	Descrição/Conteúdo
Controlo negativo	1 x 1,5ml	Verde	Incolor	Soro humano (diluído), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Controlo positivo	1 x 1,5ml	Vermelho	Amarelo	Soro humano (diluído), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Calibrador Cut-off	1 x 1,5ml	Azul	Amarelo	Soro humano (diluído), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Conjugado, IgG	1 x 15ml	Azul	Azul	Contém: Imunoglobulinas anti-humanas marcadas com peroxidase de rábano, albumina de soro bovino (BSA)
Substrato TMB	1 x 15ml	Preto	Incolor	Tetrameti benzidina estabilizada e peróxido de hidrogénio (TMB/H ₂ O ₂)
Solução de paragem	1 x 15ml	Branco	Incolor	Ácido clorídrico 1M
Microplaca	12x8 poços	N/A	N/A	Fraccionáveis. Revestimento ver ponto 1.
* Intensidade da cor aumenta com a concentração				
MATERIAIS NECESSÁRIOS				
Fotómetro para microplacas com filtro óptico para 450 nm, opcionalmente com filtro de referência opcional de 620 nm (600-690 nm). Material de vidro (cilindro 100-1000 ml), tubos de ensaio para as diluições. Agitador de tubos tipo Vortex, micropipetas (10,100, 200, 500, 1000 µl) ou multipipeta ajustável (100-1000µl). Aparelho de lavagem para microplacas (repetição 300 µl, pipeta multicanal ou sistema automatizado), papel de filtro. Os nossos testes foram concebidos para serem utilizados com água purificada segundo a definição da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP 26 – NF 21) e da Farmacopeia Europeia (Eur.Ph. 4. ^a ed.).				

4 Armazenamento e validade

Todos os reagentes e a microplaca devem ser guardados nas suas embalagens originais a 2-8°C/35-46°F. Soluções diluídas são estáveis durante 1 mês a 2-8°C/35-46°F. Devem ser cumpridas as datas de validade indicadas na embalagem e nos rótulos dos diferentes componentes.

Não usar componentes do kit que estejam fora do prazo de validade Evite a exposição da solução de substrato TMB a luz intensa. Guarde as microplacas sempre fechadas dentro da sua película de embalagem, junto com o dessecante.



5 Avisos e medidas de precaução

5.1 Risco para a saúde

ESTE PRODUTO DEVE SER USADO EXCLUSIVAMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO. A aplicação tem de ser realizada por pessoal que tenha sido especialmente instruído e formado no uso de métodos de diagnóstico in vitro. Apesar de este produto não ser considerado como particularmente tóxico ou perigoso em condições de utilização, ver o que se segue para máxima segurança:

Recomendações e medidas de precaução

Dado que alguns componentes do kit contêm reagentes potencialmente perigosos, estes podem causar uma irritação dos olhos e da pele.

ATENÇÃO: Calibradores, controlos e tampões contêm azida de sódio (NaN_3) como conservante. NaN_3 pode ter efeito tóxico, se for ingerido ou absorvido através da pele ou dos olhos. NaN_3 pode formar azidas metálicas altamente explosivas em contacto com canos de chumbo ou cobre. Para evitar concentrações de azida ao remover estas soluções deve-se passar com água em grande quantidade. É favor observar as prescrições locais/nacionais para descontaminação.

Ao trabalhar com o kit não comer, beber ou fumar. Não pipetar com a boca. Usar luvas descartáveis.

Os reagentes contidos neste produto, de origem humana (controlos e calibradores), demonstraram ser negativos após análise de antígeno de superfície da hepatite B (HbsAg), hepatite C e HIV 1 e 2. Contudo, em produtos de origem humana nunca se pode excluir com certeza definitiva a existência dos agentes patogénicos mencionados, outros ou de agentes eventualmente desconhecidos ou ainda não diagnosticados. Por isso os controlos, calibradores e soros dos doentes devem ser considerados tranANA-HEp2issores potenciais de infecções e manuseados segundo as prescrições legais vigentes no seu país.

O kit contém material de origem animal conforme indicado no índice, manuseie segundo as prescrições legais vigentes no seu país.

5.2 Avisos gerais

Caso as informações sobre o produto, incluindo a rotulagem, tiverem erros ou estiverem incorrectas, contactar o fabricante ou o fornecedor do kit de teste.

Não misturar ou substituir controlos, calibradores, conjugados ou microplacas de diferentes números de lote. Isto pode levar a variações nos resultados.

Todos os componentes do kit devem atingir a temperatura ambiente ($20\text{-}32^\circ\text{C}/68\text{-}89,6^\circ\text{F}$) e ser bem agitados antes do teste.

É impreterível seguir o protocolo prescrito para a realização do teste.

Incubação: Para a realização automática de testes recomendamos uma temperatura de $30^\circ\text{C}/86^\circ\text{F}$.

Nunca exponha os componentes do kit a temperaturas superiores a $37^\circ\text{C}/98,6^\circ\text{F}$.

Pipete a solução de substrato sempre com pontas de pipeta novas para evitar contaminações. Proteja a solução de substrato de luz intensa. Nunca pipete o a solução do conjugado com pontas de pipeta que estejam contaminadas com outros reagentes.

Um diagnóstico clínico definitivo não se deve basear somente nos resultados do teste realizado, mas deve ser elaborado pelo médico, tendo em conta todos os resultados clínicos e de laboratório. O diagnóstico deve ser impreterivelmente confirmado com diferentes métodos diagnósticos.



Product Ref.	3115
Product Desc.	ANA-HEp-2
Manual Rev. No.	004 : 2014-03-12

6 Recolha da amostra, manipulação e armazenamento

Recomenda-se a utilização de amostras de soro colhidas na altura. A extracção de sangue deve seguir os requerimentos de protocolo do seu país. Não utilize amostras de soro ictéricas, lipémicas, hemolizadas ou contaminadas por bactérias.

Em caso de amostras turvas, as partículas devem ser centrifugadas a baixa velocidade (<1000 x g). As amostras de sangue devem ser tomadas em tubos limpos, secos e vazios. Após a separação, as amostras de soro devem ser utilizadas nas primeiras 8 horas, guardadas num local bem fechado até 48 horas a 2-8°C/35-46°F, se for necessário um armazenamento mais prolongado, devem ser congeladas a -20°C/-4°F.

7 Procedimento do teste

7.1 Preparação

Diluição de reagentes concentrados:

Dilua o tampão de amostra concentrado 1:5 com água destilada (p.ex. 20 ml mais 80 ml)

Dilua o tampão de lavagem concentrado 1:50 com água destilada (p.ex. 20 ml mais 980 ml).

Para evitar erros, sugerimos a marcação das tampas dos vários calibradores.

Diluição das amostras dos doentes:

Dilua e misture as amostras de soro 1:101 com tampão de amostra (1x),

p.ex. 1000 µl tampão de amostra + 10 µl de soro.

Lavagem:

São necessários 20 ml de tampão de lavagem diluído (1x) para 8 poços ou 200 ml para 96 poços p.ex. 4 ml de concentrado mais 196 ml de água destilada.

Lavagem automatizada:

Para a colocação em serviço do instrumento e o volume morto deve, ser consideradas quantidades adicionais de tampão de lavagem.

Lavagem manual:

Remova cuidadosamente o líquido ao bater a placa sobre papel filtrante. Pipete 300 µl de tampão de lavagem diluído em cada poço, espere 20 segundos. Repita o procedimento mais duas vezes.

Microplacas:

Retire os poços não usados, armazenando-os a 2-8°C/35-46°F de forma bem fechada dentro da película da embalagem, junto com o dessecante.

7.2 Schéma de pipetage

Sugerimos a pipetagem de calibradores, controlos e amostras da seguinte forma:

	1	2	3	4...
A	NC	P2		
B	NC	P2		
C	CC	P3		
D	CC	P3		
E	PC	...		
F	PC	...		
G	P1	...		
H	P1	...		

PC: positive control

P1: patient 1

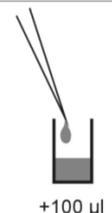
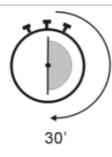
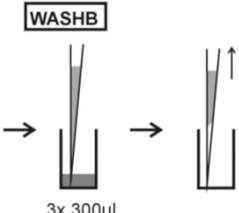
NC: negative control

P2: patient 2

CC: cut-off calibrator

P3: patient 3

7.3 Passos de teste

Pas so	Descrição
1.	Verifique se as preparações do passo 7.1 acima foram realizadas antes da pipetagem.
2.	Utilize os passos que se seguem de acordo com os resultados de interpretação quantitativa/qualitativa pretendidos:
CONTROLOS E AMOSTRAS	
3.	 <p>Pipete para os poços conforme descrito no ponto 7.2 acima, 100 µl de um dos seguintes:</p> <p>Calibrador cut-off (CC)</p> <p>Pipete 100 µl</p> <ul style="list-style-type: none"> • Controlo negativo (NC) e Controlo positivo (PC) e • Soro diluído dos pacientes (P1, P2...)
4.	 <p>Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.</p>
5.	 <p>Lave 3 vezes com 300 µl de tampão de lavagem 1:50 diluído.</p>



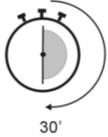
CONJUGAR

6.



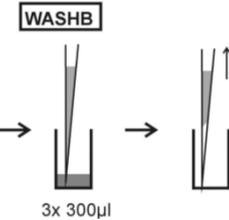
Pipete 100 µl de conjugado em cada poço.

7.



Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.

8.



Lave 3 vezes com 300 µl de tampão de lavagem 1:50 diluído.

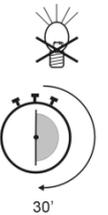
SUBSTRATO

9.



Pipete 100 µl de substrato TMB em cada poço.

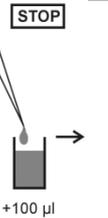
10.



Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F, protegida de luz intensa.

PARAGEM

11.



Pipete 100 µl da solução de paragem dentro de cada poço, na meANA-HEp2a sequência da pipetagem do substrato.

12.

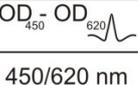


Incube durante 5 minutos, no mínimo.

13.

Agite cuidadosamente a placa durante 5 segundos.

14.



Leia a densidade óptica a 450 nm dentro de 30 minutos (recomendável a 450/620 nm).

8 Interpretação Semiquantitativa

A interpretação realiza-se com base na comparação da densidade óptica (DO) das amostras dos doentes com a densidade óptica do calibrador cut-off. Se a densidade óptica da amostra do doente se situar na gama de +/-20% do calibrador cut-off, então deve ser considerada como Duvidosa. Em caso de uma DO mais elevada, a amostra do paciente é considerada positiva, amostras com DOs mais baixas são consideradas negativas.

Negativo: DO paciente < 0,8 x DO cut-off
Duvidosos: 0,8 x DO cut-off ≤ DO paciente ≤ 1,2 x DO cut-off
Positivo: DO paciente > 1,2 x DO cut-off

Calibradores	D.O. 450/620 nm	CV % (Variância)
Controlo negativo	0,081	2,6
Calibrador cut-off	0,350	1,8
Controlo positivo	1,259	0,7

Exemplo de interpretação

Recomenda-se a pipetagem do calibrador cut-off para cada teste.

Calibrador cut-off	Amostra do paciente	Quociente DO	Interpretação
0,35 OD	0,25 OD	0,75	negativo
0,35 OD	0,40 OD	1,14	Duvidosos
0,35 OD	0,56 OD	1,60	positivo
0,35 OD	1,75 OD	5,00	positivo

Este exemplo não pode ser usado para interpretar os resultados dos pacientes!

Recomendamos novo teste em caso de resultados com valores limite. Consulte o certificado de controlo junto para dados específicos do lote. Laboratórios médicos devem realizar um controlo de qualidade interno, utilizando controlos próprios e/ou um „pool“ de soros interno segundo os regulamentos da UE.

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores normais, com base nas suas próprias técnicas, controlos, equipamento e população de doentes.

No caso dos valores dos controlos não cumprirem os critérios, o teste é inválido e deverá ser repetido.

Devem verificar-se as seguintes questões técnicas: Prazo de validade dos reagentes (preparados), condições de armazenamento, pipetas, aparelhos, fotómetro, condições de incubação e métodos de lavagem.

Se os itens testados mostrarem valores aberrantes ou qualquer tipo de desvio ou se os critérios de avaliação não forem cumpridos sem causa plausível, contactar o fabricante ou o fornecedor do kit de teste.

A formação de um quociente DO permite adicionalmente uma avaliação semiquantitativa dos resultados. Para esse efeito divide-se a densidade óptica da amostra do doente pelo parâmetro cut-off.

$$\text{Quociente DO} = \frac{\text{DO (amostra do doente)}}{\text{DO (parâmetro cut-off)}}$$



Negativo: Quociente DO < 0,8
Duvidosos: 0,8 ≤ Quociente DO ≤ 1,2
Positivo: Quociente DO > 1,2

9 Dados Técnicos

Material da amostra:: soro
 Volume de amostra: 10 µl de amostra diluída a 1:101 com tampão de amostra 1x
 Tempo total de incubação: 90 minutos à temperatura 20-32°C/68-89,6°F
 Armazenamento: a 2-8°C/35-46°F utilize apenas os frascos originais
 Número de determinações: 96 tests

10 Dados do teste / Características do teste

10.1 Especificidade e sensibilidade

A microplaca está revestida por células lysed HEp2. Não foram encontradas reactividades cruzadas a outros auto-antígenos (tTG, PR3, TPO, TG, Gliadina). ANA não são específicos para SLE mas encontram-se em várias doenças reumáticas. A detecção de ANA é um marcador muito sensível para um SLE activo e é positivo em >99% de todos os casos.

57 soros caracterizados de pacientes que sofrem de várias doenças auto-imunes (AI) (SLE, MCTD, CREST e síndrome de Sjögrens; ver tabela abaixo), obtidos a partir dos principais hospitais que tiveram um resultado positivo em IFA HEp-2 ANA (≥1:160) foram testados num dispositivo predicado e no AESKULISA ANA-HEp-2. 2 soros que eram negativos em IFA deram também um resultado negativo no AESKULISA ANA-HEp-2. Houve um acordo de 100% com o dispositivo predicado.

Doença	n.º de soro testado
SLE	39
MCTD	3
CREST	4
Síndrome de Sjögrens	4
Várias outras doenças	7

		Dispositivo predicado		
		Pos	Neg	Total
AESKULISA ANA-HEp-2	Pos	57	0	57
	Neg	0	2	2
		57	2	59

Um grupo de controlo (n=80) em que todos os resultados foram negativos no AESKULISA ANA-HEp-2.

10.2 Linearidade

Para soros seleccionados foi possível determinar uma relação linear entre diluição e concentração de anticorpos neste teste. Contudo, devido à natureza heterogénea de anticorpos humanos, não é de excluir que alguns soros apresentem um comportamento não-linear.

Amostra No.	Factor de Diluição	Concentração medida (Quociente DO)	Concentração esperada (Quociente DO)	Recuperação (%)
1	1 / 100	4,10	4.200	97,6
	1 / 200	2,10	2.100	100,0
	1 / 400	1,00	1.050	95,2
	1 / 800	0,55	0.530	103,8
2	1 / 100	6,10	6.200	98,4
	1 / 200	3,00	3.100	96,8
	1 / 400	1,59	1.550	102,6
	1 / 800	0,79	0.775	102,0

10.3 Precisão

Para determinar a precisão do ensaio, avaliou-se a variabilidade (intra e inter-ensaio) através da análise da sua reproducibilidade em três amostras de soro. Estas amostras foram seleccionadas para representar um intervalo acima da curva padrão.

Intra-Ensaio		
Amostra No.	Valor médio (Quociente DO)	CV (%)
1	4,6	1,5
2	2,8	2,0
3	1,4	1,8

Inter-Ensaio		
Amostra No.	Valor médio (Quociente DO)	CV (%)
1	4,7	3,1
2	3,0	2,5
3	1,2	2,4

10.4 Calibração

AESKULISA ANA-HEp-2 está calibrado contra soros de referência do CDC (Centers for Disease Control and Prevention) de Atlanta.

11 Bibliografia

- Peter JB, Shoenfeld Y (1996).** Autoantibodies. Elsevier Sciences B.V., Amsterdam.
- Froelich CH, Wallmann H, Skosey JL and Teodorescu M (1990).** Clinical value of an integrated ELISA system for the detection of 6 autoantibodies. The Journal of Rheumatology 17 (2): 192-200.
- Mierau R, Genth E (1998).** Autoantikörper bei systemischem Lupus erythematodes und verwandten Erkrankungen In: Thomas L. (Hrsg.) Labor und Diagnose TH-Books, Frankfurt, 15. Auflage: 843-851.
- Scholke M, Oppermann M, Helmke K, Guder WG (2000).** Antibody determination against ENA- a challenge for the routine laboratory Poster P59, 5 th Dresden Symposium on Autoantibodies.
- Tan EM, (1989).** Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv. Immunol 44: 93-151

