

Para utilização em diagnóstico *In Vitro*

Complexidade CLIA: Elevada

Aplicação Diagnóstica

O QUANTA Plex™ SLE Profile 8 é um imunoenensaio fluorescente para a detecção semi-quantitativa de auto-anticorpos de Sm, RNP, SS-A 60, SS-A 52, SS-B, Scl-70, Jo-1, Ribosome P o Chromatin no soro humano. A presença destes anticorpos pode ser utilizada em conjunção com as conclusões clínicas e outros testes de laboratório para ajudar ao diagnóstico de lúpus eritematoso sistémico e doenças do tecido conjuntivo relacionadas; Síndrome de Sjögren, Esclerodermia e Polimiosite.

Resumo e Explicação do teste

Os autoanticorpos antinucleares (ANA) encontram-se numa grande variedade de doenças do tecido conjuntivo. Testar ANA em células HEp-2 ou ANA ELISA funciona como um ensaio de rastreio de sensibilidade.¹ Embora o teste de ANA seja um excelente teste de rastreio de lúpus eritematoso sistémico (SLE), na medida em que um resultado negativo virtualmente exclui SLE² activo, não é de qualquer forma um teste específico. Os testes de acompanhamento são tipicamente feitos em soros que produzem resultados de ANA positivos. Nove dos autoanticorpos mais comuns reagem especificamente com autoantígenos a Sm, RNP, SS-A 60, SS-A 52, SS-B, Scl-70, Jo-1, Ribossoma P e cromatina. Os autoanticorpos a estes autoantígenos podem contribuir com informações significativas para diagnóstico e prognóstico quando se avaliam doentes que se suspeita sofrerem de uma variedade de doenças do tecido conjuntivo, tais como SLE², Síndrome de Sjögren³, Esclerodermia⁴ e Polimiosite⁵. Os anticorpos a Sm, RNP, SS-A 52, SS-A 60, Ribossoma P e Cromatina encontram-se em doentes com SLE^{1,6,7}; anti-SS-A 52, SS-A 60 e SS-B encontram-se em pessoas com síndrome de Sjögren^{3,8}; anti-Scl-70 e SS-A 52 em doentes com esclerodermia^{4,9}; e anti-Jo-1 e SS-A 52 em doentes com polimiosite.^{5,8,9}

Utilizou-se uma variedade de métodos incluindo ELISA, dupla difusão de Ouchterlony, "Western blot" e aglutinação passiva para detectar anticorpos a Sm, RNP, SS-A 60, SS-A 52, SS-B, Scl-70, Jo-1, Ribossoma P e cromatina. A técnica de imunoenensaio fluorescente (FIA) utilizada por QUANTA Plex™ SLE Profile 8 é objectiva, semi-quantitativa e pode utilizar-se convenientemente para testar em simultâneo grandes quantidades de doentes. Obtêm-se resultados semi-quantitativos para cada reactividade de autoanticorpos.

Princípio do método

Sm nativo, RNP, SS-B, Scl-70, SS-A 60 e Cromatina de timo de novilho, Jo-1 recombinante e SS-A 52, e um péptido sintético de 23 aminoácidos da sequência Ribossoma P estão ligados a esferas diferentes, "coloridos" por fluorescência. Foi comunicado que os autoanticorpos a SS-A 60 e SS-A 52 são importantes a nível de diagnóstico.^{8,9} As nove esferas revestidas por antígeno diferentes, bem como uma esfera de controlo anti-IgG, são misturadas em conjunto e colocadas em poços de uma placa de micropoços sob condições que conservam os antígenos no seu estado reactivo. Os controlos pré-diluídos e o soro diluído dos doentes são adicionados aos diferentes poços, permitindo que quaisquer autoantígenos a Sm, RNP, SS-A 60, SS-A 52, SS-B, Scl-70, Jo-1, Ribossoma P e cromatina presentes se liguem ao antígeno imobilizado. De seguida, adiciona-se a cada micropoço uma IgG anti-humana conjugada com uma sonda de fluorescência. Uma segunda incubação permite ao conjugado anti IgG-humana fluorescente ligar-se a todos os auto-anticorpos do doente que se encontram fixos ao antígeno nas esferas. As amostras são depois medidas no analisador de fluxo Luminex™ 100 ou 200. Este analisador de fluxo tem capacidade para separar a cor de cada esfera e medir a intensidade da fluorescência do conjugado em cada esfera.¹⁰ A intensidade da fluorescência conjugada é proporcional à quantidade de anti-IgG humana marcada fixa aos auto-anticorpos do doente na esfera.

Os autoanticorpos podem ser semi-quantificados através da comparação da intensidade de fluorescência da amostra do doente com a fluorescência do Calibrador correspondente. A esfera de controlo anti-IgG revestida está incluída em cada micropoço para assegurar que os resultados falsos negativos decorrentes de erros operacionais sejam detectados.

Reagentes

1. Placa de micropoços de poliestireno, 12 (1 x 8) tiras de micropoços com suporte, contendo esferas de 10 cores diferentes. Cada uma das esferas coloridas está revestida com um antígeno purificado diferente (Sm, RNP, SS-A 60, SS-A 52, SS-B, Scl-70, Jo-1, Ribosome P, Chromatin e anti-IgG) e um, numa embalagem de folha de alumínio contendo excipientes
2. QUANTA Plex™ Negative Control, 1 frasco de tampão contendo conservante e soro humano sem anticorpos IgG humanos contra Sm, RNP, SS-A 60, SS-A 52, SS-B, Scl-70, Jo-1, Ribosome P e Chromatin antígenos no SLE Profile 8, pré-diluído, pronto a utilizar, 1,2mL
3. SLE Profile 8 Calibrator, 1 frasco de tampão contendo conservante e anticorpos de soro humano contra os antígenos Sm, RNP, SS-A 60, SS-A 52, SS-B, Scl-70, Jo-1, Ribosome P o Chromatin, pré-diluído, pronto a utilizar, 1,2mL
4. SLE Profile 8 Positive Control, 1 frasco de tampão contendo conservante e anticorpos de soro humano contra os antígenos Sm, RNP, SS-A 60, SS-A 52, SS-B, Scl-70, Jo-1, Ribosome P o Chromatin, pré-diluído, pronto a utilizar, 1,2mL
5. Diluente para Amostras HRP, 1 frasco de cor rosa, contendo solução salina com tampão Tris, Tween 20, estabilizadores proteicos e conservantes, 50mL
6. Conjugado IgG marcado com fluorescência (cabra), anti-IgG humana (específica para fc), 1 frasco castanho – pó liofilizado, contendo tampão, estabilizadores proteicos e conservantes. Consulte a secção de Métodos para as instruções de reconstituição
7. QUANTA Plex™ Conjugate Diluent, 1 frasco – de cor rosa, contendo tampão, estabilizadores proteicos e conservantes, 7mL

Advertências

1. ADVERTÊNCIA: Este produto contém um químico (0,02% cloranfenicol) no diluente da amostra considerado como cancerígeno no Estado da Califórnia.
2. Todo o material de origem humana utilizado na preparação dos controlos deste produto foi testado e deu resultados negativos para métodos aprovados pela FDA para anticorpos anti HIV, HBsAg e HCV. Contudo,

nenhum teste pode garantir com certeza absoluta a ausência de HIV, HBV, HCV ou outros agentes infecciosos. Assim, QUANTA Plex™ Negative Control, SLE Profile 8 Calibrator o Positive Control devem ser manipulados como se fossem material potencialmente infeccioso.¹¹

3. A azida de sódio é utilizada como conservante. Este produto é venenoso e pode ser tóxico se for ingerido ou absorvido pela pele ou pelos olhos. A azida de sódio pode reagir com componentes de chumbo ou cobre das canalizações formando azidas metálicas explosivas. Por esta razão, ao deitar fora os restos de reagentes é necessário deixar correr água em quantidade abundante para evitar a formação destas substâncias.
4. Usar equipamento de protecção apropriado para trabalhar com os reagentes.
5. Os salpicos de reagentes devem ser limpos imediatamente. Observar todas as regulamentações ambientais nacionais e locais relativas à eliminação de resíduos.

Precauções

1. Utilizar somente para diagnóstico *In Vitro*.
2. A substituição de componentes do dispositivo por outros que não pertençam a este sistema pode originar resultados inconsistentes. Todos os controlos são específicos para o número de lote do kit.
3. A adaptação, total ou parcial, deste teste para processadores automatizados e outros aparelhos de processamento de líquidos pode dar origem a diferenças nos resultados obtidos nos testes por técnica manual. É da responsabilidade de cada laboratório garantir que o seu procedimento automático dá origem a resultados dentro dos limites aceitáveis.
4. Existem vários factores que influenciam o desempenho do ensaio. Entre estes inclui-se a temperatura inicial dos reagentes, a temperatura ambiente, a precisão e reprodutibilidade da técnica de pipetagem, a reprodutibilidade da técnica de mistura, o analisador de fluxo Luminex™ 100 ou 200 utilizado para ler os resultados e a duração dos tempos de incubação durante o ensaio. É necessária especial atenção à consistência para se obterem resultados rigorosos e reprodutíveis.
5. O protocolo deve ser criteriosamente respeitado.
6. Uma selagem inadequada da saqueta com tiras de micropoços e dessecantes pode provocar a degradação do antigénio e baixa precisão dos resultados.
7. Pode ser observada uma fluorescência inaceitavelmente baixa depois de múltiplas utilizações de um único frasco de conjugado de fluorescência durante algum tempo. É importante cumprir todos os procedimentos recomendados para manipulação dos conjugados fluorescentes, visando prevenir esta ocorrência.
8. A contaminação química do conjugado fluorescente pode resultar de uma limpeza ou lavagem inadequadas do equipamento ou instrumentos. Resíduos de substâncias químicas vulgares de laboratório tais como formalina, lixívia, etanol ou detergente irão provocar degradação do conjugado fluorescente no decurso do tempo. Lave exaustivamente todo o equipamento ou instrumentos com água destilada ou desionizada depois da utilização de desinfectantes/ produtos de limpeza químicos.

Precauções particulares de conservação

1. Conservar todos os reagentes a 2-8°C. Não congelar. Os reagentes permanecem estáveis até à data de validade indicada, quando armazenados e manipulados conforme descrito no protocolo.
2. As tiras dos micropoços revestidas com antigénios que não forem logo utilizadas, devem ser seladas na embalagem protectora original com dessecantes e conservadas a 2-8°C.

Colheita da amostra

Este procedimento deve ser efectuado com uma amostra de soro. A adição de azida ou de outros conservantes às amostras do teste pode interferir negativamente nos resultados. As amostras de soro com contaminação bacteriana, que sofreram tratamento térmico ou contendo partículas visíveis não devem ser utilizadas. Hemolizados ou muito serum dos lipémicos não deve ser usado.

Após a colheita, o soro deve ser separado do coágulo. O documento H18-A3 da CLSI (anteriormente NCCLS) recomenda as seguintes condições de armazenamento para as amostras: 1) Não armazenar as amostras à temperatura ambiente durante mais de 8 horas. 2) Se o teste não for concluído num prazo de 8 horas, guardar a amostra a 2-8°C. 3) Se o teste não for concluído num prazo de 48 horas, ou se houver transporte da amostra, congelar a -20°C ou a uma temperatura inferior. As amostras congeladas devem ser bem agitadas depois de descongelarem e antes de serem testadas.

Procedimento

Material fornecido

- 1 Placa de micropoços de SLE Profile 8, (12-1 x 8 poços), (cor de rose estampado na cor), com suporte
- 1 1,2 mL QUANTA Plex™ Negative Control, pré-diluído, pronto a utilizar
- 1 1,2 mL SLE Profile 8 Calibrator, pré-diluído, pronto a utilizar
- 1 1,2 mL SLE Profile 8 Positive Control, pré-diluído, pronto a utilizar
- 1 50 mL Diluente da amostra HRP
- 1 Conjugado IgG marcado com fluorescência (cabra), anti-IgG humana (específica para fc)
- 1 7 mL QUANTA Plex™ Conjugate Diluent

Material adicional necessário mas não fornecido

Fluido de preservação de analisador de fluxo Luminex™ 100 ou 200

Micropipetas de 5 e 500 µL

Pontas descartáveis para as micropipetas

Tubos de teste para diluições de amostras de doentes, volume de 1-4 mL

Água destilada ou desionizada

Analisador de fluxo Luminex™ 100 ou 200

Pipetador electrónico de 8 canais para a dispensa de 5, 45, e 50 µL ou Dispositivo de pipetagem/diluição automatizado

Utilização do Analisador de Fluxo Luminex™ 100 ou 200

1. Consulte o manual do utilizador fornecido com o Luminex™ para instruções detalhadas sobre o funcionamento do analisador de fluxo Luminex™ 100 ou 200 e a Versão Sistema Integrado (IS) do programa de software do

Luminex™ Versão 2,0 ou superior. Para mais informações e para a resolução de problemas com este ensaio, contacte a assistência técnica da INOVA Diagnostics, Inc. na morada ou número de telefone presentes na última página do Folheto Informativo. Seguem-se instruções resumidas para funcionamento do analisador de fluxo Luminex™ 100 ou 200.

2. Calibre o Luminex™ utilizando as esferas de Controlo e Calibração fornecidas pela Luminex Corporation pelo menos uma vez por mês e confirme que a calibração tem sucesso. Para além disso, calibre o Luminex™ se a temperatura de calibração delta for superior a 3 graus, se os controlos do ensaio estiverem fora do intervalo ou conforme for necessário.
3. Luminex™ demora 30 minutos a aquecer depois de ter sido ligado. Quando o período de aquecimento se concluir, efectue as operações de purga, irrigação com álcool e lavagem recomendadas pelo fabricante.
4. Utilizar a Versão do software IS, carregue o modelo "QP SLE Profile 8" e assegure-se de que todas as informações de lote estão correctas. Se for necessário, actualize as informações do lote. Defina os parâmetros da seguinte forma. As cores das esferas são SS-A 60 = 17, SS-A 52 = 19, SS-B = 7, Sm = 8, RNP = 9, Scl-70 = 11, Jo-1 = 12, Ribosomal-P = 13, Chromatin = 14, anti-IgG de controlo = 42. Defina as ocorrências por esfera para 50, o tamanho da amostra para 50 µL, o débito para 60 µL/minuto (rápido) e o portão para 7500 a 17000, Utilizam-se os valores medianos para a Intensidade Média de Fluorescência (MFI).
5. Introduza os nomes da amostra manualmente, ou clicando em "Load Pa List".
6. Carregue a placa na plataforma XY do Luminex™.
7. Faça funcionar o Luminex™ clicando no botão "Start Plate".
8. Quando terminar o dia, execute as operações de sanear e embeber antes de desligar o instrumento.

Método:

Antes de iniciar

1. Para programar informações para o equipamento automatizado, contacte a Assistência Técnica da INOVA Diagnostics, Inc.
2. Ligue o analisador de fluxo Luminex™ 100 ou 200, assegure-se de que aqueceu e efectue todas as operações de manutenção diárias conforme previamente descrito. Se for necessário, calibre o instrumento e confirme que a calibração teve sucesso.
3. Coloque todos os reagentes e amostras do doente à temperatura ambiente (20-26°C) e misture bem.
4. Se o conjugado fluorescente de anti-IgG humana não tiver sido reconstituído, adicione 6mL de QUANTA Plex™ Conjugate Diluent ao frasco castanho contendo o pó liofilizado e rode o recipiente durante aproximadamente 30 segundos para dissolver o conteúdo. O conjugado fluorescente reconstituído permanece estável durante 3 meses entre 2 e 8°C. **Não congele.**
5. Certifique-se de que o recipiente do fluido de preservação no Luminex™ está cheio de fluido de protecção disponível na Luminex Corporation.
6. Prepare uma diluição a 1:101 de cada amostra do doente adicionando 5µL de cada soro a 500µL de Diluente para Amostras HRP, e depois coloque no vórtice para misturar exaustivamente a solução. As amostras diluídas devem ser utilizadas no prazo de 8 horas depois da preparação. **NÃO DILUA** o QUANTA Plex™ Negative Control, SLE Profile 8 Calibrator e Positive Control.
7. A determinação da presença ou da ausência de anticorpos a Sm, RNP, SS-A 60, SS-A 52, SS-B, Scl-70, Jo-1, Ribossoma P e cromatina utilizando unidades arbitrárias requer um micropoço para Controlo Negativo e Positivo QUANTA Plex™, dois micropoços para o Calibrador SLE Profile 8 e um micropoço para cada amostra do doente. Recomenda-se a execução das amostras em singleto.

Técnica

1. **Todos os reagentes devem ser colocados à temperatura ambiente (20-26°C) antes de começar o ensaio.** Coloque o número necessário de micropoços/tiras no suporte. **Volte imediatamente a colocar as tiras não utilizadas no saco contendo exsiccantes e vede com firmeza para minimizar a exposição a vapor de água e luz.**
2. Adicionar 45µL de Diluente de Amostra HRP a cada micropoço que contenha uma amostra do doente. **Não** adicionar Diluente de Amostra HRP aos quatro primeiros micropoços, uma vez que estes contêm o Controlo Negativo QUANTA Plex™, O Calibrador SLE Profile 8 (em duplicado) e o Controlo Positivo SLE Profile 8. **Não** adicione as amostras dos doentes diluídas aos micropoços neste momento.
3. Mantenha um das seguintes sequências de coordenação quando adicionar controlos, amostras e conjugado aos micropoços. Em virtude das amostras serem lidas sucessivamente, a uma taxa de aproximadamente 1 amostra a cada 19 segundos (ou uma tira de 8 poços em aproximadamente 2½ minutos) pelo Luminex™, as amostras dos doentes e também o conjugado devem ser adicionados aos micropoços a esta taxa, para minimizar qualquer variação da frente para trás do ensaio. Se os controlos, amostras ou o conjugado forem adicionados um de cada vez, proteja a adição destes ao próximo micropoço em 19 segundos. Se os controlos, amostras ou o conjugado forem adicionados 8 de cada vez a uma tira, proteja cada adição à tira seguinte 2½ minutos. Estes dois esquemas de coordenação irão demorar aproximadamente 30 minutos para a adição de amostras a todas as 12 tiras de uma placa inteira e irão minimizar a variação da frente para trás do ensaio.
4. Submeter ao Vórtice, e depois adicionar 50µL de cada um dos seguintes: o Controlo Negativo QUANTA Plex™ **pré-diluído** ao primeiro micropoço, o Calibrador SLE Profile 8 no segundo e no terceiro micropoços e o Controlo Positivo SLE Profile 8 no quarto micropoço. Tem que ser utilizada uma pipeta electrónica quando se adicionarem manualmente as amostras e se misturarem as esferas. Utilize uma das sequências de coordenação para adicionar os controlos conforme descrito o passo 3. **Pipete vigorosamente pelo menos 30 µL do C QUANTA Plex™ Negative Control, SLE Profile 8 Calibrator e Positive Control para cima e para baixo quatro vezes, para misturar as esferas e os controlos em cada micropoço.** O tempo de incubação de 30 minutos inicia-se depois de adicionar o QUANTA Plex™ Negative Control, ao **primeiro** micropoço.
5. Prossiga imediatamente com o ensaio adicionando 5 µL de soro do doente diluído aos micropoços adequados (nota: tal produz uma diluição final a 1:1010 do soro do doente). Mantenha a mesma sequência de coordenação utilizada no passo 4. **Misture a amostra do doente diluída e o HRP Diluente para Amostras no micropoço pipetando vigorosamente pelo menos 30 µL dos conteúdos do micropoço para cima e para baixo quatro vezes.** Adicione 50 µL do Positivo Baixo ANCA Profile **pré-diluído** ao micropoço adequado depois da última adição da amostra do doente e misture conforme descrito acima. Prossiga com a coordenação da incubação durante 30 minutos a partir do momento da adição do QUANTA Plex™ Negative Control,. Coloque a tira de micropoços à temperatura ambiente, numa superfície nivelada e afastada da luz solar directa

- durante o resto do período de incubação.
- No final do primeiro período de incubação, adicione 50 µL do conjugado fluorescente a cada micropoço e **pipete vigorosamente pelo menos 60 µL do conteúdo do micropoço para cima e para baixo quatro vezes**. Para adicionar o conjugado, mantenha a mesma sequência de coordenação utilizada nos passos 4 e 5. O conjugado deve ser removido do frasco em condições assépticas padrão e utilizando boas técnicas de laboratório. Retire apenas do frasco a quantidade de conjugado necessária para o ensaio. **PARA EVITAR POTENCIAL CONTAMINAÇÃO MICROBIANA E/OU QUÍMICA, NUNCA VOLTE A COLOCAR CONJUGADO NÃO UTILIZADO NO FRASCO**. Incube as tiras de micropoços durante 30 minutos à temperatura ambiente, numa superfície nivelada e afastada da luz solar directa. O período de incubação inicia-se depois da **primeira** adição do conjugado.
 - No prazo de uma hora depois da conclusão da incubação de 30 minutos do conjugado fluorescente, leia a placa de SLE Profile 8 no Luminex™ conforme detalhado na secção acima, "Utilização do Analisador de Fluxo Luminex™ 100 ou 200".

Controlo de qualidade

- O SLE Profile 8 Calibrator e Positive Control e QUANTA Plex™ Negative Control devem ser processados com todos os lotes de amostras para garantir que todos os reagentes e procedimentos actuam correctamente.
- Uma vez que o Positivo baixo SLE Profile 8 Calibrator e Positive Control e do QUANTA Plex™ Negative Control se encontram pré-diluídos, estes não controlam o procedimento associado à diluição das amostras.
- Outros controlos podem ser testados de acordo com as directivas ou requerimentos locais e/ou nacionais ou de acordo com as disposições de organizações acreditadas. Outros controlos adequados podem ser preparados efectuando alíquotas de amostras de soro humano e conservando a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
- Para que os resultados dos testes possam ser considerados válidos, devem ser cumpridos todos os critérios a seguir definidos. Se algum não for cumprido, o teste deve ser considerado inválido e o ensaio repetido. O valor, em Unidades de Luminex (UL), do Calibrator para cada antigénio está indicado no rótulo da caixa para esse kit. Consulte a fórmula na secção de Cálculo dos Resultados para determinar as ULs do QUANTA Plex™ Negative Control e do SLE Profile 8 Positive Control.
 - O valor do Controlo Negativo pré-diluído QUANTA Plex™ tem de ser <20 LU em cada um dos 9 antigénios e entre 10 e 50 LU na esfera anti-IgG.
 - O valor do Controlo Positivo de SLE Profile 8 tem de ser ≥ 100 e ≤ 300 LU nos antigénios Sm, RNP, SS-A 60, SS-B Scl-70, Jo-1, Ribo-P e cromatina e tem de ser ≥ 50 e ≤ 250 no antigénio SS-A 52. O Controlo Positivo de SLE Profile 8 tem de ser entre 10 e 50 LU na esfera anti-IgG.
 - A esfera de controlo anti-IgG destina-se a assegurar que os resultados falsos negativos do doente decorrentes de erros operacionais sejam detectados. Existe a possibilidade de que não se tenha adicionado a amostra e/ou o conjugado do doente ao poço da amostra do doente se a esfera anti-IgG da amostra do doente tiver sido inferior a 3,0 LU e se tiver sido negativa nas outras esferas. Neste caso, o doente deve ser testado novamente para confirmar o resultado negativo.
 - O utilizador deve recorrer ao documento C24-A3 da CSLI (anteriormente NCCLS) para obter instruções suplementares sobre as práticas do Controlo de Qualidade apropriadas.
- QUANTA Plex™ Negative Control e do SLE Profile 8 Profile Calibrator, Profile Positive e as Positive Control para monitorizar falhas substanciais dos reagentes.
- Se se desejar, pode testar-se um poço com diluente da amostra mas sem soro para confirmar se a esfera de controlo anti-IgG detectará um poço sem soro. Este controlo isento de soro deve ser $< 3,0$ LU na esfera Anti-IgG e negativo em todas as outras esferas.

Cálculo dos resultados

As MFIs para todos os controlos e amostras do doente para cada antigénio são determinadas em primeiro lugar. A reactividade, em UL, de uma determinada amostra para cada tipo de antigénio pode ser depois calculada através da fórmula que se segue: Divida a MFI da amostra pela MFI do SLE Profile 8 Calibrator para esse antigénio e multiplique o resultado pelo número de UL atribuído ao Perfil de SLE Profile 8 Calibrator para esse antigénio. A ULs value do SLE Profile 8 Calibrator para cada antigénio está indicada no rótulo da caixa para esse lote do kit. O exemplo seguinte destina-se a determinar a reactividade anti-Sm. Utilize a fórmula equivalente à cada uma do outra antigénio.

$$\text{Valor da amostra (em UL)} = \frac{\text{MFI da Amostra para Sm}}{\text{MFI Calibrator para Sm}} \times \text{Valor do Positivo Baixo para MPO (em UL)}$$

A amostra pode ser depois classificada de acordo com o quadro abaixo.

| | UL |
|-------------------|--------|
| Negativa | < 20 |
| Positiva fraca | 20-49 |
| Positiva moderada | 50-100 |
| Positiva forte | > 100 |

A reactividade está relacionada com a quantidade de auto-anticorpo presente na esfera, de forma não linear. Embora aumentos e diminuições das concentrações de anticorpos dos doentes se reflectam num aumento ou diminuição correspondentes da reactividade da fluorescência, a alteração não é proporcional (ou seja, uma duplicação da concentração de anticorpos não se reflecte numa duplicação da reactividade). Para além disso, a quantidade total de IgG no soro de um doente afecta a MFI determinada. Caso seja necessária uma quantificação mais rigorosa dos auto-anticorpos do doente, a amostra deve ser submetida a um teste quantitativo.

Interpretação dos resultados

A FIA consiste numa técnica extremamente sensível e tem capacidade para detectar pequenas diferenças em populações de doentes. Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo do normal com base nas suas técnicas, controlos, equipamento e população de doentes, de acordo com os seus procedimentos estabelecidos.

Sugere-se que os resultados reportados pelo laboratório devam incluir a declaração: "Os resultados que se seguem foram obtidos com o INOVA QUANTA Plex™ SLE Profile 8. Valores obtiveram com métodos de ensaio de outros fabricantes não podem ser utilizados em substituição. A magnitude dos níveis de auto-anticorpos IgG reportados nem sempre pode estar correlacionada com um título de parâmetro de avaliação final."

Limitações do método

1. A presença de imuno complexos ou de outros agregados de imunoglobulinas na amostra do doente podem causar um aumento do nível de ligação não-específica e produzir resultados falsos positivos neste ensaio.
2. Nem todos os doentes com Lupus érythémateux systémique, syndrome de Gougerot-Sjögren, Sclérodemie ou Polymyosite foram positivos a auto-anticorpos Sm, RNP, SS-A 60, SS-A 52, SS-B, Scl-70, Jo-1, Ribosome P ou Chromatin.
3. Os resultados deste ensaio devem ser utilizados em conjunto com as conclusões clínicas e outros testes serológicos.
4. Não agitar adequadamente os controlos e/ou as amostras de soro diluídas, com as microesferas conservados na placa, pode aumentar os valores de %CV, em relação aos valores típicos encontrados nos testes ELISA.
5. Depois da meia-hora de incubação com o conjugado fluorescente, ocorre um aumento de fluorescência de aproximadamente 10% por cada meia hora adicional ao tempo de incubação.
6. As características de desempenho do ensaio não foram determinadas para outras matrizes além do soro.
7. A falha na manutenção dos tempos de adição dos reagentes pode provocar um aumento "Front-to-back" das variações dos testes.

Valores esperados

A capacidade do teste QUANTA Plex™ SLE Profile 8 para detectar anticorpos Sm, RNP, SS-A 60, SS-A 52, SS-B, Scl-70, Jo-1, Ribosome P e Chromatin foi avaliada mediante comparação com testes ELISA e Luminex™ disponíveis no mercado, comercializados pela INOVA Diagnostics, Inc. Assumiram-se os resultados do ELISAs e de cada um dos testes QUANTA Plex™ ENA Profile 6 e cada um do QUANTA Plex™ SLE Profile 8 como positivos se a amostra do doente fosse igual ou superior a 20 unidades e negativos se inferior a 20 unidades.

Intervalo de valores normais

Foram testadas 485 amostras de sangue de dadores normais no teste de QUANTA Plex™ SLE Profile 8. Incluídas na tabela abaixo de cada antigénio estão as percentagens destas amostras que foram negativas, a média e o desvio padrão deste grupo, o valor mais elevado no grupo e o número de desvios padrão acima da média que foram utilizados para o valor de *cut-off* entre negativo e positivo.

| Antigénio | % Negativo | Média LU | Desvio Padrão | O Valor O mais elevado | # of DP Acima Da Média |
|------------|------------|----------|---------------|------------------------|------------------------|
| Sm | 99,4 | 3 | 2.4* | 130 | 7.1 |
| RNP | 99,6 | 2 | 3.5 | 59 | 5.1 |
| SS-A 52 | 99,0 | 5 | 3.5* | 226^ | 4.3 |
| SS-A 60 | 99,4 | 3 | 4.4* | 213^ | 3.9 |
| SSB | 99,2 | 3 | 2.8 | 44 | 6.1 |
| Scl-70 | 100 | 3 | 1.2 | 14 | 14.2 |
| Jo-1 | 100 | 1 | 0.6 | 5 | 31.7 |
| Ribosome P | 100 | 4 | 1.9 | 13 | 8.4 |
| Chromatin | 99,0 | 5 | 4.8 | 66^ | 3.1 |

*Os doentes com LU acima de 100 unidades não constaram no cálculo do desvio padrão.

^ Estes resultados são provenientes do mesmo doente.

Comparação entre os Ensaio SLE Profile 8, ENA Profile 6 e ELISAs

| n=437 | SS-A^ ENA Profile 6 | | |
|--|---------------------|----------|----------|
| SS-A 52 SLE Profile 8 92,0% o mesmos | | Negativo | Positivo |
| | Negativo | 326 | 35* |
| | Positivo | 0 | 76 |

^ Este SS-A contem SS-A 52 e SS-A 60

*29 destes eram positivos por SS-A 60 Luminex

| n=437 | SS-A^ ENA Profile 6 | | |
|--|---------------------|----------|----------|
| SS-A 60 SLE Profile 8 93,1% o mesmos | | Negativo | Positivo |
| | Negativo | 326 | 30* |
| | Positivo | 0 | 81 |

^ Este SS-A contem SS-A 52 e SS-A 60

*24 destes eram positivos por SS-A 52 Luminex

| n=437 | SS-A^ ENA Profile 6 | | |
|--|---------------------|----------|----------|
| SS-A 52 or 60 SLE Profile 8 98,6% o mesmos | | Negativo | Positivo |
| | Negativo | 326 | 6* |
| | Positivo | 0 | 105 |

^ Este SS-A contem SS-A 52 e SS-A 60

*4 positivo perto SS-A^ ELISA

| n=437 | SS-B ENA Profile 6 | | |
|---|--------------------|----------|----------|
| SS-B SLE Profile 8 99,8% o mesmos | | Negativo | Positivo |
| | Negativo | 406 | 1* |
| | Positivo | 0 | 30 |

* Isto é negativo perto ELISA

| n=437 | Sm ENA Profile 6 | | |
|---------------------------------------|------------------|----------|----------|
| Sm SLE Profile 8 95,0% o mesmos | | Negativo | Positivo |
| | Negativo | 361 | 1* |
| | Positivo | 21** | 54 |

* Negativo perto ELISA; **12 positivo perto ELISA

| n=437 | RNP ENA Profile 6 | | |
|---|-------------------|----------|----------|
| RNP SLE Profile 8 98,6% o mesmos | | Negativo | Positivo |
| | Negativo | 341 | 4* |
| | Positivo | 2** | 90 |

*3 positivo perto ELISA; **0 positivo perto ELISA

| n=437 | Scl-70 ENA Profile 6 | | |
|--|----------------------|----------|----------|
| Scl-70 SLE Profile 8 95,9% o mesmos | | Negativo | Positivo |
| | Negativo | 368 | 15* |
| | Positivo | 3** | 51 |

*8 positivo perto ELISA; **0 positivo perto ELISA

| n=437 | Jo-1 ENA Profile 6 | | |
|---|--------------------|----------|----------|
| Jo-1 SLE Profile 8 98,9% o mesmos | | Negativo | Positivo |
| | Negativo | 412 | 5* |
| | Positivo | 0 | 20 |

* 0 eram positivo perto ELISA

| n=412 | Ribosome P ELISA | | |
|---|------------------|----------|----------|
| Ribosome P SLE Profile 8 97,6% o mesmos | | Negativo | Positivo |
| | Negativo | 383 | 8 |
| | Positivo | 2 | 19 |

| n=412 | Chromatin ELISA | | |
|--|-----------------|----------|----------|
| Chromatin SLE Profile 8 92,2% o mesmos | | Negativo | Positivo |
| | Negativo | 313 | 26 |
| | Positivo | 6 | 67 |

Positivo e Negativo Por cento Do Acordo

| N = 437 | Ambos - | Ambos + | Prof 6 - Prof 8 + | Prof 6 + Prof 8- | Positivo Acordo | Negativo Acordo | Total Acordo |
|----------|---------|---------|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| SS-A* | 326 | 105 | 0 | 6 | 95% | 100% | 98,6% |
| SS-B | 406 | 30 | 0 | 1 | 97% | 100% | 99,8% |
| Sm | 361 | 54 | 21 | 1 | 98% | 95% | 95,0% |
| RNP | 341 | 90 | 2 | 4 | 96% | 99% | 98,6% |
| Scl-70 | 368 | 51 | 3 | 15 | 77% | 99% | 95,9% |
| Jo-1 | 412 | 20 | 0 | 5 | 80% | 100% | 98,9% |
| N = 412 | | | | | | | |
| Ribo P** | 383 | 19 | 2 | 8 | 70% | 99% | 97,6% |
| Chrom** | 313 | 67 | 6 | 26 | 72% | 98% | 92,2% |

*SS-A bead compared to SS-A 52 and SS-A 60 beads; **compared to ELISA

Precisão e Reprodutibilidade

Varição inter-ensaio e variação intra-ensaio. No que diz respeito à variação inter-ensaio, foram avaliadas várias amostras em 6 testes realizados em dias diferentes. A variação em 2 amostras diferentes para cada especificidade de teste encontra-se na lista da tabela abaixo. No que diz respeito à variação intra-ensaio, 7 avaliadas várias amostras dez vezes cada uma num único ensaio. A variação em 2 amostras diferentes para cada especificidade de teste encontra-se na lista da tabela abaixo.

Varição inter-ensaio

| Antígeno | Média UL | % C.V. |
|----------|----------|--------|
| Sm | 64 | 6% |
| Sm | 38 | 5% |
| RNP | 74 | 5% |
| RNP | 33 | 9% |
| SS-A 52 | 158 | 14% |
| SS-A 52 | 101 | 8% |
| SS-A 60 | 108 | 6% |
| SS-A 60 | 75 | 4% |
| SS-B | 127 | 7% |
| SS-B | 83 | 6% |
| Scl-70 | 56 | 15% |
| Scl-70 | 31 | 13% |

Varição intra-ensaio

| Antígeno | Média UL | % C.V. |
|----------|----------|--------|
| Sm | 61 | 9% |
| Sm | 38 | 2% |
| RNP | 64 | 10% |
| RNP | 27 | 11% |
| SS-A 52 | 167 | 5% |
| SS-A 52 | 91 | 5% |
| SS-A 60 | 119 | 5% |
| SS-A 60 | 69 | 6% |
| SS-B | 149 | 2% |
| SS-B | 76 | 3% |
| Scl-70 | 64 | 3% |
| Scl-70 | 48 | 6% |

Varição inter-ensaio

| Antígeno | Média UL | % C.V. |
|-----------|----------|--------|
| Jo-1 | 50 | 10% |
| Jo-1 | 69 | 14% |
| Ribo-P | 73 | 7% |
| Ribo-P | 98 | 9% |
| Chromatin | 65 | 11% |
| Chromatin | 84 | 8% |

Varição intra-ensaio

| Antígeno | Média UL | % C.V. |
|-----------|----------|--------|
| Jo-1 | 42 | 6% |
| Jo-1 | 59 | 3% |
| Ribo-P | 65 | 10% |
| Ribo-P | 105 | 4% |
| Chromatin | 61 | 7% |
| Chromatin | 80 | 6% |

Referências

1. von Mühlen CA and Tan E: Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 24: 323-358, 1995.
2. Tan EM, et al.: The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 25: 1271-1277, 1982.
3. Jonsson R, Haga HJ and Gordon TP: Current concepts on diagnosis, autoantibodies and therapy in Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 29: 341-348, 2000.
4. Giordano M, Valentini IG, Migliaresi S, et al: Different antibody patterns and different prognoses in patients with scleroderma and various extent of skin sclerosis. *J Rheumatol* 13: 911-916, 1986.
5. Arnett, J, et al.: The Jo-1 antibody system in myositis: relationships to clinical features and HLA. *J Rheumatol* 8: 925, 1981.
6. Bonfa E, et al.: Association between lupus psychosis and anti-Ribosome P protein antibodies. *N Engl J Med* 317: 265, 1987.
7. Burlingame RW and Cervera R: Anti-chromatin (anti-nucleosome) autoantibodies. *Autoimmunity Reviews* 1: 321-328, 2002.
8. McCauliffe DP, Wang L, Satoh M, Reeves WH and Small D: Recombinant 52 kDa Ro(SSA) ELISA detects autoantibodies in Sjögren's syndrome sera that go undetected by conventional serologic assays. *J Rheumatol* 24: 860-866, 1997.
9. Frank MB, V McCubbin, E Trieu, Y Wu, DA Isenberg, IN Targoff: The association of anti-Ro52 autoantibodies with myositis and scleroderma autoantibodies. *J Autoimmun* 12:137-142, 1999.
10. Martins TB, Burlingame R, von Mühlen CA, et al: Evaluation of multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for detection of autoantibodies to nuclear antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 1054-1059, 2004.
11. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control/National Institutes of Health, 5th edition, 2007.
12. CLSI (NCCLS). Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document H18-A3, Vol. 24(38), 2004.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Feb 1999. Statistical quality control: Principles and definitions; Approved Guideline- 3rd edition C24-A3, Vol. 26, No. 25.

Fabricado por:

INOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America

Representante Autorizado:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

Technical Service
628910

888-545-9495
July 2007
Revision PRT2

