


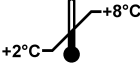




REF 43735 	ZENIT RA GBM		Distribuído por: 
INSTRUÇÕES PARA A UTILIZAÇÃO		  50	

APLICAÇÃO

O teste *ZENIT RA GBM* é um teste imunológico por quimioluminescência (CLIA) para a determinação quantitativa, com instrumento específico, analisador *ZENIT RA*, dos anticorpos específicos da classe IgG dirigidos contra a Membrana Basal Glomerular (Glomerular Basal Membrane ou GBM), em amostras de soro ou de plasma humano (EDTA, Citrato de Sódio).

Este ensaio é empregue como auxílio de diagnóstico para a avaliação da síndrome de Goodpasture e para o diagnóstico diferencial das vasculites.

ATENÇÃO: Qualquer decisão médica não poderá basear-se unicamente no resultado deste teste, mas deverá incluir o conjunto de todos os dados clínicos e laboratoriais disponíveis.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Os anticorpos antimembrana basal glomerular (anti-GBM) são o *marker* serológico de uma doença auto-imune rara, caracterizada clinicamente pela presença de uma glomerulonefrite de progressão rápida e histologicamente por uma glomerulonefrite necrotizante extra-capilar, com imunofluorescência linear (glomerulonefrite por anticorpos anti-GBM). Quando, simultaneamente, se apresenta um problema pulmonar (alveolite hemorrágica) toma o nome de síndrome de Goodpasture (GP)¹.

É acertado o papel patogénico dos anticorpos, de facto o dano tecidual é induzidos pela ligação dos anticorpos anti-GBM à membrana basal glomerular (e alveolar)².

O auto-antigénio alvo foi identificado no domínio extra colagenásico (NC1) na cadeia $\alpha 3$ do colagénio de tipo IV presente exclusivamente nas membranas basais dos rins, pulmões, cóclea e olhos³.

A síndrome de Goodpasture é uma doença muito grave que, na falta de um tratamento adequado e rápido, tem um desenvolvimento frequentemente fulminante⁴. Apesar dos progressos terapêuticos, a sobrevivência do paciente e do órgão em questão ainda está ligada ao grau de insuficiência renal quando essa se apresenta, portanto, é essencial o diagnóstico precoce para a sobrevivência do paciente e para a recuperação da função renal.

O diagnóstico da doença por anticorpos anti-GBM ou GP baseia-se na demonstração, através de um método de imunofluorescência directa em biopsia renal, de depósitos lineares de imunoglobulinas na membrana basal glomerular. Todavia, em muitas situações, a biopsia renal não pode ser executada ou deve ser adiada, portanto é fundamental o diagnóstico serológico. Os Anti-GBM circulantes podem ser detectados por imunofluorescência indirecta nos rins dos primatas; o método caracteriza-se por uma elevada especificidade

mas tem uma sensibilidade inadequada⁵. Actualmente encontram-se à disposição métodos de determinação imunométricos, quantitativos e específicos para o antígeno, baseados em métodos ELISA, fluoroenzimatismo e de quimioluminescência, que utilizam a GBM inteira solubilizada, a cadeia $\alpha 3(IV)$ do colagénio e, mais recentemente o antígeno de GP em forma recombinante humana⁶. A sensibilidade de diagnóstico dos testes específicos do antígeno é muito elevada, situando-se entre os 94,7 e os 100%, enquanto a especificidade para os controlos patológicos varia entre 90,9 e 100%⁶. Dados muito recentes confirmam que, apesar dos ótimos desempenhos de diagnóstico dos métodos, em cerca de 5% dos pacientes afectados pela doença de anticorpos anti-GBM / síndrome de Goodpasture não se detectam auto-anticorpos circulantes⁷.

Pelo seu importante significado clínico e pelos valores elevados previstos, a pesquisa de anticorpos anti-GBM é indicada no enquadramento diagnóstico de pacientes com quadros clínicos de insuficiência renal de origem desconhecida com microematuria, de modo especial nos casos de progressão rápida.

A titulação dos anticorpos anti-GBM circulantes tem utilidade prognóstica⁸.

Em presença de uma síndrome renal-pulmonar os anticorpos anti-GBM podem ser detectados em cerca de um terço dos pacientes.

Os anticorpos anti-GBM são directamente responsáveis pelo dano no órgão, portanto o seu controlo é considerado muito útil para conduzir o tratamento, em especial de plasmaférese. A negatividade persistente para anti-GBM é uma condição indispensável para os pacientes a aguardar uma transplantação renal, para reduzir ao mínimo a possibilidade que a doença se possa reapresentar no órgão transplantado.

Como também as vasculites sistémicas associadas a ANCA podem apresentar-se com um quadro clínico de GN rapidamente progressiva, é útil executar, simultaneamente à pesquisa de anti-GBM, a pesquisa dos ANCA. Também é útil recordar que numa percentagem significativa de pacientes com anti-GBM (10 a 38%) estão também presentes ANCA, geralmente com especificidade para a mieloperoxidase (ANCA-MPO), cujo significado clínico não é claro^{6,9,10}. Por vezes, um quadro de GNRP pode ser secundário de patologias sistémicas do tecido conectivo ou de infecções.

No que respeita à utilidade diagnóstica do dado laboratorial, é útil recordar que os valores preditivos, positivo e negativo (VPP, VPN), dependem, para além da sensibilidade e especificidade do teste, da prevalência da doença na população averiguada. Um pedido apropriado (elevada probabilidade pré-teste) consente obter um resultado realmente clinicamente útil e reduz significativamente a possibilidade de resultados falsos positivos.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O kit *ZENIT RA GBM* para a determinação quantitativa das IgG específicas antimembrana basal glomerular, utiliza um método imunológico indirecto em dois passos, baseado no princípio da quimioluminescência.

O antígeno altamente purificado NC1 $\alpha 3(IV)$ é utilizado para revestir as partículas magnéticas (fase sólida) e um anticorpo anti-IgG humanas é marcado com um derivado do éster de acridínio (conjugado).

Durante a primeira incubação, os anticorpos específicos presentes na amostra, nos calibradores ou nos controlos, ligam-se à fase sólida.

Durante a segunda incubação, o conjugado reage com os anticorpos anti-GBM capturados pela fase sólida.

Depois de cada incubação, o material não aderido à fase sólida é removido por aspiração e subsequente lavagem.

A quantidade de conjugado marcado que ficou aderido à fase sólida é avaliada através da reacção de quimioluminescência e da medição do sinal luminoso. O sinal gerado, expresso em unidades relativas de luz (RLU, Relative Light Unit), é indicativo da concentração de anticorpos específicos presentes na amostra, nos calibradores e nos controlos.

AUTOMATIZAÇÃO

O *Analizador ZENIT RA* executa automaticamente todas as operações previstas pelo protocolo do ensaio: adição na cuvette de reacção, as amostras, calibradores, controlos, partículas magnéticas, conjugado e soluções de activação de quimioluminescência; separação magnética e lavagem das partículas; medição da luz emitida.

O sistema calcula os resultados do ensaio para as amostras e para os controlos através da curva de calibração memorizada e imprime um relatório que inclui todas as informações relativas ao ensaio e ao doente.

MATERIAIS E REAGENTES

Materiais e reagentes fornecidos

REAG	1	MP	2,5 mL
------	---	----	--------

Partículas magnéticas revestidas com o antigénio altamente purificado NC1 α 3(IV) em Tampão Fosfato contendo proteínas estabilizantes, um tensoactivo, Pro-Clin 300 e azida de sódio (< 0,1 %) como conservantes.

REAG	2	CONJ	15 mL
------	---	------	-------

Anticorpo monoclonal de rato anti-IgG humana, marcado com um derivado do éster de acridina (conjugado), em tampão fosfato com proteínas estabilizantes e azida de sódio (< 0,1%) como conservante.

REAG	3	DIL	25 mL
------	---	-----	-------

Solução diluente de amostras: Tampão Fosfato contendo soroalbumina bovina, tensoactivo, corante azul e azida de sódio (<0,1%) como conservante.

REAG	4	CAL A	1,6 mL
------	---	-------	--------

Soro humano com baixa concentração de anticorpos anti-GBM IgG em tampão fosfato com soroalbumina bovina, tensioactivo, corante azul inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO4 como conservantes.

REAG	5	CAL B	1,6 mL
------	---	-------	--------

Soro humano com elevada concentração de anticorpos anti-GBM IgG em tampão fosfato com soroalbumina bovina, tensioactivo, corante azul inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO4 como conservantes.

Todos os reagentes estão prontos a usar.

Os reagentes 1, 2 e 3 são embalados em conjunto constituindo um cartucho de reagentes.

As concentrações dos calibradores são indicadas em UA/mL (Unidades Arbitrárias) e calibradas em relação a um padrão de referência interno. Os valores das concentrações são específicos para cada lote de produto e estão registados no DATA DISK incluído no kit.

DATA DISK

Mini-DVD que contém as informações relativas a todos os produtos da Linha ZENIT RA (Reagentes, Calibradores, Soros de controlo) actualizados até ao último lote de produção à excepção dos produtos expirados na data de realização de cada DATA DISK novo.

Basta conservar o DATA DISK com o número de lote mais elevado para manter actualizadas as informações necessárias para o funcionamento correcto do sistema.

Materiais e reagentes necessários mas não fornecidos no kit

- ZENIT RA Analyzer Cód. nº 41400
- ZENIT RA Cuvette Cube * Cód. nº 41402
Embalagem de 960 cuvetes.
- ZENIT RA System Liquid * Cód. nº 41409
1 garrafa de 0,5 litros de solução 10x.
- ZENIT RA Wash Solution * Cód. nº 41407
1 garrafa de 0,5 litros de solução 20x.
- ZENIT RA Trigger Set * Cód. nº 41403
1 frasco de 250 mL de Trigger A (solução de pré-activação)
1 frasco de 250 mL de Trigger B (solução de pré-activação)
- ZENIT RA D-SORB Solution Cód. nº 41436
Embalagem de 2 garrafas de 1 litro de solução pronta a usar.

- ZENIT RA Cartridge Checking System * Cód. nº 41401
- ZENIT RA Top Cap Set Cód. nº 41566
300 tampas externas para tapar os tubos dos calibradores após a primeira utilização.

(*) O analisador ZENIT RA e os acessórios identificados pelo asterisco são fabricados por Immunodiagnostic Systems S.A., Rue E. Solvay, 101, B-4000 Liège, Bélgica e distribuídos por A. Menarini Diagnostics Srl.

Outros Reagentes Aconselhados

ZENIT RA ANCA/GBM CONTROL SET Cód. nº 41449
3 ampolas de 1,5 mL de soro humano negativo e 3 ampolas de 1,5 mL de soro humano positivo para anticorpos anti-GBM.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Os reagentes fornecidos no kit *ZENIT RA GBM* são exclusivamente para uso em diagnóstico *in vitro* e não para uso *in vivo* em pessoas ou animais.

Este produto deve ser usado por utilizadores profissionais respeitando rigorosamente as instruções deste documento.

A Menarini não pode ser considerada responsável por perdas ou danos provocados por uma utilização diferente da indicada nas instruções fornecidas.

Precauções de segurança

Este produto contém material de origem animal e, portanto, deve ser manuseado como potenciais agentes infecciosos.

Este produto contém componentes de origem humana. Todas as unidades de soro, ou plasma, utilizadas para o fabrico dos componentes deste Kit, foram analisadas com métodos aprovados pela FDA e resultaram não reactivas para HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1 e anti-HIV2.

Todavia, como nenhum método de análise é capaz de garantir a ausência de agentes patogénicos, todo o material de origem humana deve ser considerado potencialmente infeccioso e manuseado como tal.

Se a embalagem estiver estragada, com derramamento dos reagentes, descontaminar a área afectada com uma solução diluída de Hipoclorito de Sódio utilizando dispositivos de protecção individual adequados (bata, luvas, óculos).

Eliminar o material utilizado e os resíduos da embalagem afectada pelo derramamento, de acordo com as normas nacionais para a eliminação de lixos potencialmente infecciosos.

Alguns reagentes contêm azida de sódio como conservante. Como a azida de sódio pode reagir com o chumbo, cobre e latão revestido de chumbo, formando azidas explosivas nos canos, aconselha-se a não deitar reagentes ou resíduos no esgoto mas respeitar as normas nacionais em matéria de eliminação de lixos potencialmente perigosos.

Precauções de utilização

Para assegurar a obtenção de resultados válidos devem ser rigorosamente respeitadas estas instruções de utilização e as indicações do manual de operação do instrumento.

Os reagentes fornecidos no kit devem ser utilizados exclusivamente com o sistema *ZENIT RA Analyzer*.

Os componentes do cartucho de reagentes não podem ser retirados do cartucho e reagrupados novamente.

Não usar o kit para além do prazo de validade.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Os reagentes fornecidos no kit estão todos prontos a usar.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Conservar os reagentes fornecidos no kit entre 2 e 8°C em posição vertical e às escuras.

Nestas condições, o cartucho de reagente e os calibradores que não tiverem sido abertos estarão estáveis até ao fim do prazo de validade.

O cartucho de reagentes, depois de aberto, poderá ser utilizado por 60 dias, se conservado no frigorífico entre 2 e 8°C ou a bordo da máquina.

ou a bordo da máquina.

Os calibradores, depois de abertos, poderão ser utilizados por 60 dias, se conservados no frigorífico entre 2 e 8°C e se a permanência a bordo da máquina não ultrapassar as 6 horas por sessão.

Não congelar os reagentes e os calibradores.

PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

O ensaio deve ser executado em amostras de soro e de plasma humano (EDTA – Citrato de Sódio).

Desaconselha-se o uso de amostras lipémicas, hemolisadas e turvas.

Se o ensaio for executado mais de 8 horas depois da colheita das amostras, separar o soro do coágulo, ou o plasma dos glóbulos vermelhos transferir o sobrenadante do tubo primário para um tubo secundário seco.

Antes de serem analisadas, as amostras podem ser conservadas no frigorífico entre 2 e 8°C no máximo por 7 dias.

Se o ensaio for executado mais de 7 dias depois, conservar as amostras congeladas (< - 20°C).

Evitar congelamentos e descongelamentos repetidos.

PROCEDIMENTO

Para obter desempenhos analíticos válidos, respeitar escrupulosamente as instruções do manual de operação do instrumento.

Carregamento dos reagentes

Os reagentes fornecidos no kit estão todos prontos a usar.

Antes de inserir o cartucho de reagentes no sistema, o tubo das partículas magnéticas deve ser agitado por rotação horizontal de modo a facilitar a suspensão das partículas. Executar a operação evitando a formação de espuma.

Colocar o cartucho de reagentes na área dos reagentes do analisador, utilizando as indicações para o efeito e deixar em agitação durante pelo menos 60 minutos antes de usar.

A colocação do cartucho de reagentes determina simultaneamente a leitura do código de barras de identificação. Se o rótulo do cartucho estiver estragado ou que a leitura falte por qualquer outro motivo, os dados de identificação do cartucho de reagentes podem ser introduzidos manualmente.

O analisador mantém automaticamente as partículas magnéticas em agitação contínua.

Se o cartucho de reagentes for retirado do analisador, deve ser conservado na vertical e às escuras entre 2 e 8°C.

Carregamento dos calibradores

Os calibradores ZENIT RA estão prontos a usar. Deixar os calibradores à temperatura ambiente durante 10 minutos e agitar delicadamente o conteúdo, manualmente ou por vórtex, evitando a formação de espuma.

Se o calibradores estiverem a ser utilizados pela primeira vez, eliminar o selo de garantia e a tampa branca de fecho antes da sua introdução no analisador.

Se os calibradores já tiverem sido utilizados antes, o recipiente terá a tampa superior (tampa vermelha) sem o selo de garantia. Eliminar a tampa vermelha antes da introdução no analisador.

Introduzir os calibradores no analisador, na área das amostras; para a sua identificação no analisador, consultar o manual de instruções do analisador. Os dados do código de barras devem ser inseridos manualmente se o rótulo estiver estragado ou se não for possível efectuar a sua leitura.

Os valores da concentração de anticorpos IgG anti-GBM presente nos calibradores estão registados no DATA DISK e são transferidos automaticamente para o analisador.

No final da sessão, os recipientes dos calibradores devem ser tapados com as respectivas tampas superiores (tampas vermelhas) e conservados entre 2 e 8°C até à sua próxima utilização.

Os calibradores só podem ser utilizados ao máximo quatro vezes.

Carregamento dos controlos

Introduzir os controlos na área das amostras do analisador. Para a sua identificação no analisador, consultar o manual de instruções do mesmo. Em caso de ausência do código de barras no controlo, ou em caso de falta de leitura, os seus dados de identificação podem ser inseridos manualmente. No caso em que sejam utilizados os Controlos Zenit RA, consultar as respectivas instruções. Os valores da concentração de anticorpos IgG anti-GBM presente nos calibradores estão registados no DATA DISK e são transferidos automaticamente para o analisador. Seleccionar os parâmetros requeridos para cada controlo.

Carregamento das amostras

Introduzir as amostras no analisador, na respectiva área; para a sua identificação no analisador, consultar o manual de instruções do mesmo. Em caso de falta do código de barras na amostra ou em caso de falha de leitura, os dados de identificação da amostra podem ser introduzidos manualmente.

Seleccionar os parâmetros requeridos para cada amostra.

Calibração

O *Analizador ZENIT RA* utiliza uma curva de calibração memorizada (master curve), criada pelo fabricante para cada lote de cartuchos de reagentes.

Os parâmetros das “master curve”, juntamente com os valores das concentrações dos calibradores, estão memorizados no DATA DISK e são transferidos para a base de dados do analisador.

Os calibradores (A e B) são utilizados para calibrar a “master curve” quer em função do analisador utilizado, quer dos reagentes a bordo.

Para executar a calibração, analisar os dois calibradores (A e B) em triplicado e realizar uma réplica por cada controlo. Os valores de concentração obtidos com os controlos permitem validar a nova calibração.

Assim que a calibração da “master curve” tiver sido aceite e memorizada, todas as amostras seguintes poderão ser analisadas sem outra calibração, excepto nos seguintes casos:

- quando estiver carregado a bordo do analisador um cartucho de reagentes com um lote novo;
- quando os valores dos controlos não estiverem dentro do intervalo de aceitabilidade;
- quando for executada a operação de manutenção do analisador;
- quando tiver expirado a validade da “master curve” calibrada.

O prazo de validade da “master curve” calibrada para o kit *ZENIT RA GBM* é de 21 dias.

A gestão da calibração é accionada automaticamente pelo analisador.

Ensaio

Premir o botão de início.

1. O sistema aspira 80 µL de Diluente de amostras, 40 µL de Partículas magnéticas, 100 µL de Diluente de amostras e 10 µL de amostra ou de controlo (para os calibradores, o soro positivo é fornecido já diluído com o Diluente de amostras e o volume recolhido é de 110 µL). As soluções e as suspensões aspiradas são distribuídas na cuvete de reacção.
2. A cuvete de reacção é incubada no rotor a 37°C durante 10 minutos.
3. Depois desta fase de incubação, as partículas magnéticas são separadas e lavadas.
4. São distribuídos 200 µL de conjugado na cuvete.
5. A cuvete de reacção é incubada no rotor a 37°C durante 10 minutos.
6. Depois desta última fase de incubação, as partículas magnéticas são separadas e lavadas e a cuvete é transferida para a câmara de leitura.
7. A quantidade de conjugado aderido à fase sólida, expressa em RLU, é directamente proporcional à concentração de IgG anti-GBM presente na amostra.
8. Os resultados obtidos são interpolados na curva de calibração e expressos em concentrações.

As amostras com valores de concentração mais elevados do limite superior do intervalo de medição podem ser diluídas e testada novamente. O novo valor obtido é multiplicado pelo factor de diluição utilizado para obter o resultado final.

CONTROLO DE QUALIDADE

Para assegurar a validade do ensaio, devem ser testados soros de controlo com níveis diferentes de concentração (pelo menos um soro negativo e um soro positivo) cada dia em que se executa o ensaio.

De acordo com as práticas de qualidade de cada laboratório, para a verificação dos resultados do ensaio, podem ser realizados mais controlos, ou mais frequentemente. Siga os procedimentos de qualidade locais.

Se forem utilizados os soros de controlo ZENIT RA, os valores médios esperados e os limites de aceitabilidade são os indicados no DATA DISK, dados também presentes na embalagem dos controlos.

Se forem utilizados soros de controlo diferentes, é necessário, antes da sua utilização, definir os valores esperados com os reagentes e com o sistema ZENIT RA.

Se o valor dos controlos não estiver dentro do intervalo de aceitabilidade especificado, os respectivos resultados do ensaio são inválidos e essas amostras devem ser analisadas novamente.

Neste caso é necessário executar uma calibração antes da repetição do ensaio.

CÁLCULO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Cálculo dos resultados

A concentração dos anticorpos IgG anti-GBM presentes nas amostras testadas é calculada automaticamente pelo sistema. Os valores podem ser visualizados no ecrã ou impressos.

As concentrações são expressas em UA/mL.

O cálculo da concentração na amostra é efectuado através da leitura do resultado obtido para cada amostra numa curva de calibração elaborada com um sistema de “fitting” logístico de quatro parâmetros (4PL, Y ponderado), corrigida periodicamente em função dos resultados obtidos para os calibradores.

Para mais informações sobre o sistema de cálculo dos resultados, consultar o manual de instruções do sistema.

Interpretação dos resultados

O intervalo de medição do ensaio ZENIT RA GBM é de: 0,0 a 1000 UA/mL.

Os valores inferiores a 0,0 UA/mL são valores extrapolados, aparece a mensagem “OMR-“e/ou ORA e são expressos com valor “igual a 0,0 UA/mL”.

Os valores superiores a 1000 UA/mL têm a mensagem “OMR+” e/ou ORA e podem ser novamente ensaiados após a devida diluição.

Os resultados das amostras podem ser interpretados do seguinte modo:

(UA/mL)	Interpretação
< 40	A amostra deve ser considerada Negativa pela presença de IgG anti-GBM
≥ 40	A amostra deve ser considerada Positiva pela presença de IgG anti-GBM

Os valores acima mencionados devem ser considerados como valores indicativos. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios intervalos de referência.

LIMITES DO ENSAIO

Para efeitos de diagnóstico, os resultados obtidos com o kit *ZENIT RA GBM* e o sistema *ZENIT RA Analyzer* devem ser utilizados em conjunto com os outros dados clínicos e de laboratório à disposição do médico.

A contaminação bacteriana das amostras e a inativação por calor podem influenciar o resultado do ensaio.

Os anticorpos heterofilos presentes nas amostras de soro humano podem reagir com os reagentes à base de imunoglobulinas, provocando interferências nos ensaios imunológicos *in vitro*. Estas amostras podem dar origem a valores anormais, se analisados com o kit *ZENIT RA GBM*.

Em alguns casos as amostras de doentes com doenças crónicas do fígado, infecções crónicas, doenças do colagénio e mieloma com hipergamaglobulinemia (concentração de IgG superior a 1800 mg/dL), podem apresentar resultados positivos de IgG anti-GBM.

VALORES PREVISTOS

Foram analisadas as amostras de 100 dadores saudáveis para verificar a presença de anticorpos IgG anti-GBM.

Todas as amostras analisadas deram resultados negativos, com um valor médio de 1,1 UA/mL e um desvio padrão de 3,2 UA/mL.

Com os resultados obtidos foi calculado o "Limit of Blank" (LoB = o valor mais elevado que podemos esperar numa série de amostras que não contenham o analito). O "Limit of Blank", determinado como 95º da percentagem de população negativa, resultou igual a 6,3 UA/mL com o Lote de reagentes nº 2.

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

Com o kit ZENIT RA GBM foi ensaiado um total de 156 amostras, 30 das quais de pacientes que sofrem da síndrome de Goodpasture (GP), 2 amostras de pacientes que sofrem de glomerulonefrite de progressão rápida (GNRP), 95 amostras de pacientes com patologias diferentes (18 conectivites sistémicas, 12 vasculites associadas a ANCA, 15 artrites reumatóides, 4 de celiarquia, 38 patologias infecciosas, 8 patologias diversas), 29 amostras de indivíduos normais.

Na população presumivelmente negativa (18 conectivites sistémicas, 12 vasculites associadas a ANCA, 15 artrites reumatóides, 4 celiarquias, 38 patologias infecciosas, 8 patologias diversas e 29 amostras de indivíduos normais) estudada, nenhuma amostra deu resultado positivo.

- **Especificidade do diagnóstico:** 100% (intervalo de confiança a 95%: 96.3 a 99,9%); em 124 amostras, 124 deram resultados negativos.

Na população presumivelmente positiva (30 amostras de pacientes afectados por síndrome de Goodpasture (GP) e 2 amostras de pacientes afectados por glomerulonefrite de progressão rápida (GNRP)) estudada, todas as amostras deram resultados positivos.

- **Sensibilidade do diagnóstico:** 100% (intervalo de confiança a 95%: 86,7 a 99,7%); (32/32 amostras).

Com base nos resultados da especificidade e da sensibilidade do diagnóstico, o acordo diagnóstico é de 100% (intervalo de confiança a 95%: 96,7 a 99,9%); (156/156 amostras).

DESEMPENHO

Advertência: os dados apresentados não representam as especificações de funcionamento do kit, mas constituem a evidência experimental em como o kit funciona dentro dessas especificações no modo previsto pelo fabricante.

Precisão e Reprodutibilidade

A **precisão** foi calculada analisando os resultados quatro soros com 20 repetições (um negativo e três positivos com diferentes concentrações de anti-Sm GBM) executados com dois lotes de reagentes diferentes na mesma sessão experimental.

A concentração do soro anti-GBM IgG-negativo (N4) estava compreendida no intervalo de 0,0 a 0,4 UA/mL com o Lote de reagentes n.º 2 e 0,0 UA/mL com o Lote de reagentes n.º 3.

Na Tabela estão indicados os resultados obtidos com os 3 soros positivos.

Amostra	Reagentes Lote nº	Concentração média (UA/mL)	SD (UA/mL)	CV %
P1	2	81,4	2,52	3,1
	3	64,7	2,07	3,2
P2	2	243,5	18,82	7,7
	3	270,9	11,88	4,4
P3	2	471,5	13,57	2,9
	3	371,9	12,06	3,2

A **repetibilidade** foi calculada analisando os resultados da determinação de seis soros (um negativo e cinco positivos com diferentes concentrações de IgG anti GBM) executada individualmente, em 14 sessões diferentes, com um lote de reagentes.

A concentração do soro anti-GBM IgG-negativo (EBV-N1) estava compreendida no intervalo de 0,5 a 2,2 UA/mL.

Na Tabela estão indicados os resultados obtidos com os cinco soros positivos.

Amostra	Concentração média (UA/mL)	SD (UA/mL)	CV %
GBM-P1	51,2	4,62	9,0

GBM-P2	205,0	15,06	7,3
GBM-P3	296,3	28,84	9,7
GBM-P4	91,6	7,16	7,8
GBM-P5	222,8	18,68	8,4

Linearidade das Diluições

Para avaliar a linearidade das diluições do del kit *ZENIT RA GBM* foram ensaiadas diluições graduadas de 3 soros com elevada concentração de IgG anti-GBM, executadas com o Líquido de sistema.

Os resultados deste estudo estão resumidos na tabela seguinte.

Amostra	Factor de diluição	Concentração medida (UA/mL)	Concentração prevista (UA/mL)	Recuperação %
1	1	338,0	--	(100)
	2	169,0	169,0	100,0
	4	83,2	84,5	98,5
	8	42,1	42,3	99,5
2	1	353,3	-	(100)
	2	173,0	176,7	97,9
	4	93,0	88,3	105,3
	8	42,7	44,2	96,6
3	1	223,6	-	(100)
	2	124,0	111,8	110,9
	4	67,4	55,9	121,0
	8	33,9	28,0	121,1

De qualquer modo torna-se necessário sublinhar que nem todos os soros, quando medidos em diluições diferentes, podem dar resultados não lineares dentro do intervalo de medição dependendo o resultado não só da concentração mas também da afinidade dos anticorpos presentes na amostra.

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do kit *ZENIT RA GBM*, expressa como **limite de detecção** (*Limit of Detection – LoD*: ou seja, a menor quantidade de analisado que o método é capaz de medir) foi avaliada utilizando a fórmula para o cálculo $LoD = LoB + C_{\beta} SD_s$ (onde LoB representa o valor do "Limit of Blank", SD_s o desvio padrão previsto da distribuição da amostra em baixa concentração e C_{β} é derivado do 95° percentil da distribuição padrão gaussiana).

Foram utilizadas 5 amostras de baixa concentração de analisado, determinadas individualmente com um Lote de reagentes em 14 ensaios diferentes.

O Limite de detecção do kit *ZENIT RA GBM* foi igual a 13,5 UA/mL.

Os valores do limite de detecção, juntamente com as considerações de carácter clínico e com os resultados de comparação com métodos de referência, contribuíram para a definição do valor de *cut-off*.

Especificidade Analítica: Interferências

O desempenho do ensaio não foi influenciado pela presença na amostra de substâncias potencialmente interferentes, indicadas na tabela seguinte, até à concentração ensaiada

Substâncias Potencialmente Interferentes	Concentração máxima testada
Bilirrubina livre	20 mg/dL
Bilirrubina conjugada	20 mg/dL
Hemoglobina	1000 mg/dL
Triglicéridos	3000 mg/dL

Desaconselha-se o uso de amostras lipémicas, hemolisadas ou turvas.

Especificidade analítica: Reacções cruzadas

Para avaliar as potenciais reacções cruzadas do antigénio, utilizado para sensibilizar as partículas magnéticas, foi conduzido um estudo com 49 amostras, todas com níveis altos de outros auto-anticorpos e negativos para anti-GBM IgG.

As amostras utilizadas estava assim divididas : CCP e/ou FR (15), Gliadina A e/ou G e/ou tTG-A (4), positivos a ANCA (12) e ANA e/ou ENA (18).

O estudo não demonstrou nenhuma reacção cruzada significativa do antigénio em fase sólida com os outros auto-anticorpos.

Efeito de saturação em doses elevadas

Alguns métodos imunológicos empregues para a determinação de amostras que contêm o analito em concentrações extremamente elevadas podem fornecer níveis aparentes de analito que estão subestimados em relação ao conteúdo real (Efeito hook).

O método utilizado no kit *ZENIT RA GBM*, sendo um método com duas incubações, não sofre esse efeito.

Uma amostra com concentração extremamente elevada (acima do intervalo de medição) de IgG anti-GBM confirmou a ausência de efeito "hook" até à concentração de 1552 UA/mL.

Sensibilidade e Especificidade Relativas

A presença de anticorpos IgG anti-GBM foi determinada utilizando o kit *ZENIT RA GBM* e um método de ensaio ELISA disponível no mercado em 156 amostras: 30 amostras de pacientes afectados pela síndrome de Goodpasture (GP), 2 amostras de pacientes afectados por glomerulonefrite de progressão rápida (GNRP), 95 amostras de afectados por patologias diferentes (18 conectivites sistémicas, 12 vasculites associadas a ANCA, 15 artrites reumatóides, 4 celiaquias, 38 patologias infecciosas, 8 patologias diversas), 29 amostras de indivíduos normais.

5 amostras deram origem a resultados divergentes entre o ensaio *ZENIT RA* e o método ELISA disponível no mercado.

A **concordância relativa** foi assim igual a 96,8% (intervalo de confiança a 95%: 92,3 a 98,8%); (151/156 amostras).

A **sensibilidade relativa** foi igual a 90,9% (intervalo de confiança a 95%: 74,5 a 97,6%); (30/33 amostras).

A **especificidade relativa** foi igual a 98,4 % (intervalo de confiança a 95%: 93,7 a 98,7%); (121/123 amostras).

As três amostras com resultados negativos com o kit ZENIT RA GBM, e positivos com o kit ELISA pertenciam: 1 ao grupo das amostras com patologias infecciosas, 1 ao grupo das amostras com patologias diversas e 1 ao grupo das amostras de indivíduos normais.

As duas amostras com resultados positivos com o kit ZENIT RA GBM e negativos com o kit ELISA pertenciam ambas ao grupo das amostras com a síndrome de Goodpasture.

BIBLIOGRAFIA

1. Salama AD, Levy JB, Lightstone, Pusey CD. Goodpasture's disease. Lancet 2001; 358: 917-20.
2. Lerner RA, Glassock RJ, Dixon FJ, The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. J Exp Med 1967; 126: 989-1004.
3. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. N Engl J Med 2003; 348: 2543-56.
4. Levy JB, Turner AN, Rees AJ, Pusey CD. Long-term outcome of anti-glomerular basement membrane antibody disease treated with plasma-exchange and immunosuppression. Ann Int Med 2001; 134: 1033-42.
5. Wilson CB, Dixon FJ. Diagnosis of immunopathologic renal disease. Kidney Int 1974; 5: 389-401.
6. Sinico RA, Radice A, Corace C, Sabadini E. Anti-glomerular basement membrane antibodies in the diagnosis of Goodpasture syndrome: a comparison of different assays. Nephrol Dial Transplant 2006; 21: 397-401.
7. Mahler M, Radice A, Sinico RA, Damoiseaux J, Seaman A, Buckmelter K et al. Performance evaluation of a novel chemiluminescence assay for detection of anti-GBM antibodies: an International multicenter study. Nephrol Dial Transplant 2012; 27 (1): 243-52.
8. Segelmark M, Hellmark T, Wieslander J. The prognostic significance in Goodpasture's disease of specificity, titre and affinity of anti-glomerular-basement membrane antibodies. Nephron Clin Pract 2003; 94: 59-68.
9. Hellmark T, Niles JL, Collins AB, McCluskey RT, Brunmark C. Comparison of anti-GBM antibodies in sera with or without ANCA. J Am Soc Nephrol 1997; 8: 376-85.

10. Levy JB, Hammad T, Coulthart A, Dougan T, Pusey CD. Clinical feature and outcome of patients with both ANCA and anti-GBM antibodies. *Kidney Int* 2004; 66: 1535-40.



TECHNOGENETICS S.r.l.
Viale Casiraghi 471
20099 – Sesto San Giovanni (MI) - Itália

PORTUGAL

Distribuído por

A. Menarini Diagnósticos, Lda.

Quinta da Fonte - Edifício D. Manuel I, 2º B

2770-203 Paço de Arcos

Tel. +351 210 93 00 00 - Fax +351 210 93 00 01

www.menarinidiag.pt