

REF 41426 	ZENIT RA β_2- Glycoprotein I IgG	Distribuído por 
INSTRUÇÕES PARA A UTILIZAÇÃO	   100	

APLICAÇÃO

O teste *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG* é um teste imunológico quimioluminescente (CLIA) para a determinação quantitativa, com instrumentação dedicada, *Analizador ZENIT RA*, dos anticorpos específicos de classe IgG dirigidos contra a β_2 -Glicoproteína I em amostras de soro ou de plasma humano (EDTA, Heparina).

Este ensaio é utilizado como técnica de diagnóstico suplementar na avaliação da síndrome de antifosfolípidos (APS).

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

SIGNIFICADO CLÍNICO

A presença de anticorpos antifosfolípidos (aPL) em pacientes com trombozes venosas e/o arteriais ou em doentes com complicações obstétricas é o marcador essencial de laboratório (em conjunto com LAC) para o diagnóstico da “*síndrome de anticorpos antifosfolípidos (APS)*”¹.

De acordo com os critérios de Sapporo, actualizados em 2006¹, o diagnóstico de APS pode ser definido na presença de pelo menos um critério clínico e um de laboratório.

Os critérios de laboratório prevêem a positividade persistente ao longo do tempo (12 semanas) com um título médio/alto de anticorpos anti-cardiolipina (aCL) e/ou anticorpos anti- β_2 -Glicoproteína I (a β_2 GPI) e/ou anticorpos “lupus anticoagulant” (LAC).

Os anticorpos aCL e a- β_2 GPI podem ser de isotipo G ou M e ter um título superior a 40 U/mL.

A presença de anticorpos antifosfolípidos foi demonstrada pela primeira vez em 1941 em amostras de doentes com diagnóstico serológico de sífilis². Foi evidenciado que o soro destes doentes tinha uma interacção com o fosfolípido cardiolipina, contido nas camadas de coração bovino do teste VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) considerado específico para o diagnóstico da sífilis.

A especificidade do ensaio VDRL foi posta em discussão pelos numerosos resultados de falsa positividade em amostras de doentes com doenças auto-ímmunes sistémicas e na ausência de doenças venéreas. Em 1983, Harris et al.³, utilizando um método de elevada sensibilidade para a determinação dos anticorpos anti-cardiolipina, encontraram em 61% dos doentes com LES, concentrações elevadas de aCL, demonstrando uma correlação significativa entre níveis de anticorpos e as trombozes venosas e arteriais, o “lupus anticoagulant” e a trombocitopenia.

Em 1990, dois grupos de pesquisadores independentes ^{4,5} demonstraram que, para evidenciar os anticorpos anti-cardiolipina, é indispensável a presença da β_2 -Glicoproteína I.

A β_2 -Glicoproteína I tem um peso molecular de aproximadamente 50 kDa, uma concentração plasmática de cerca de 0,15 a 0,30 mg/mL e uma função biológica ainda hoje obscura (parece capaz de modular o metabolismo das lipoproteínas, de interferir em algumas reacções coagulativas e ter um efeito antiagregante das plaquetas⁶⁻⁹). Estudos cristalográficos recentes definiram a estrutura tridimensional da proteína e a sua organização em 5 domínios ¹⁰⁻¹¹, fornecendo informações úteis sobre o funcionamento desta molécula.

Em especial, o V domínio apresenta numerosos resíduos de lisina que são responsáveis pela interacção electrostática da β_2 -Glicoproteína I com os fosfolípidos aniónicos das membranas celulares¹². Com o mesmo mecanismo, *in vitro*, obtém-se a ligação entre a β_2 -Glicoproteína I e a cardiolipina adsorvida na fase sólida. Foi amplamente demonstrado que os anticorpos anti-cardiolipina de doentes com a síndrome de anticorpos antifosfolípidos reconhecem uma porção modificada da β_2 -Glicoproteína I; esses auto-anticorpos não são capazes de reconhecer a cardiolipina, a β_2 -Glicoproteína nativa não ligada a fases sólidas ou a outras estruturas ^{4,5,13-15}.

Os conhecimentos adquiridos até hoje permitem-nos definir os anticorpos anti-cardiolipina como anticorpos capazes de se ligar a neoepítomos gerados pela ligação entre β_2 -Glicoproteína e cardiolipina adsorvida em uma fase sólida.

Foi posteriormente demonstrado^{4,16} que os anticorpos anticardiolipina nos doentes com doenças auto-imunes podem reconhecer a β_2 -Glicoproteína I adsorvida directamente em microplacas de polistireno, tratado com UV ou irradiado. Também neste caso, o reconhecimento da molécula pelos auto-anticorpos é determinado pelas modificações estruturais provocadas pela ligação da proteína à fase sólida.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG* para a determinação quantitativa dos anticorpos IgG específicos anti- β_2 -Glicoproteína I utiliza um método imunológico indirecto, em dois passos, baseado no princípio da quimioluminescência.

A β_2 -Glicoproteína I é utilizada para revestir as partículas magnéticas (fase sólida) e um anticorpo anti-IgG humano é marcado com um derivado do éster de acridina (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- β_2 -Glicoproteína I IgG 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 β_2 -Glicoproteína I em tampão fosfato com proteínas estabilizantes, tensoactivo, Pro-Clin 300 e azida de sódio (< 0,1%) como conservantes.

REAG	2	CONJ	25 mL
------	---	------	-------

Anticorpo monoclonal de rato anti-IgG humano, 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 Amostra: tampão fosfato com soroalbumina bovina, tensoactivo, corante azul inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO₄ como conservantes.

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

Soro humano com baixa concentração de anticorpos anti- β_2 -Glicoproteína I IgG em tampão fosfato com soroalbumina bovina, tensoactivo, 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- β_2 -Glicoproteína I 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 contra 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 com 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 APS IgG CONTROL SET Cód. Nº 41450
3 tubos de 1,5 mL de soro humano negativo e 3 tubos de 1,5 mL de soro humano positivo para anticorpos anti- β_2 -Glicoproteína I.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Os reagentes fornecidos no kit ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN IgG 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.

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 humanas de soro e de plasma (EDTA - Heparina).

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 e 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 as amostras forem conservadas mais de 7 dias antes do ensaio, devem ser 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 30 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 no escuro entre 2 e 8°C.

Carregamento dos calibradores e dos controlos

Os calibradores e os controlos ZENIT RA estão prontos a usar. Deixar os calibradores e os controlos à temperatura ambiente durante 10 minutos e agitar cuidadosamente, manualmente ou com um vortex, evitando a formação de espuma. Não inverter o tubo e não retirar a tampa perfuradora (tampa amarela para os calibradores e tampas verdes ou azuis para os controlos).

No caso em que os calibradores ou os controlos, sejam utilizados pela primeira vez, premir a tampa perfuradora para baixo até ao fim. Deste modo, a membrana que veda o tubo será perfurada tornando assim possível o acesso ao líquido contido no mesmo. Se a tampa perfuradora for utilizada correctamente, a risca vermelha que se encontra no topo do rótulo ficará coberta (Fig. 1 – Tubo selado e Tubo perfurado).

Os calibradores e/ou os controlos, já utilizados, deverão ser fechados com uma tampa externa branca de modo que a risca vermelha do rótulo fique coberta.

Só devem ser carregados no instrumento os tubos sem tampa externa (tampa branca) e com a risca vermelha do rótulo coberta (Fig. 1 – Tubo perfurado).

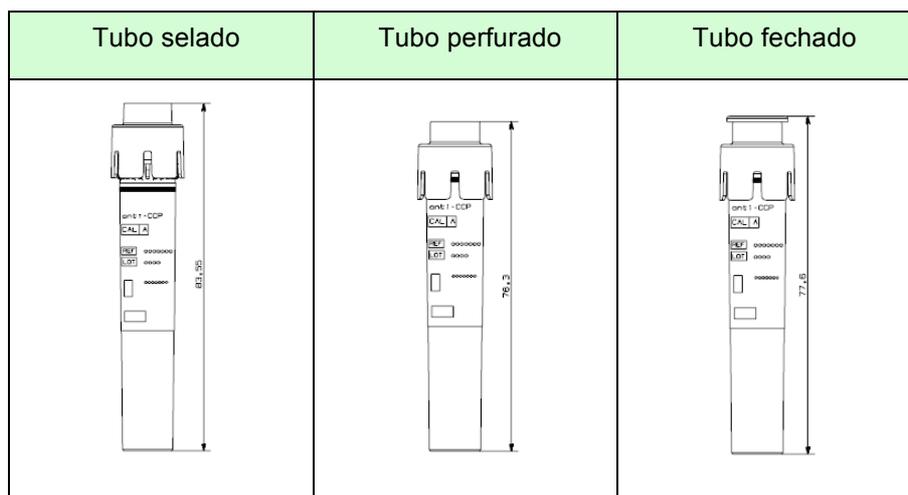
Introduzir no analisador os calibradores ou os controlos na área das amostras, depois da leitura do código de barras. Os dados do código de barras também podem ser introduzidos manualmente se o rótulo estiver estragado ou em caso de falha da leitura.

Os valores da concentração de anticorpos IgG anti- β_2 -Glicoproteína I presente nos calibradores ou nos controlos, estão registados no DATA DISK e são transferidos automaticamente para o analisador. Em caso de falha de transferência dos dados, é possível introduzi-los manualmente.

No final da sessão, os tubos dos calibradores e dos controlos devem ser fechados com as respectivas tampas externas (tampas brancas) e conservados entre 2 e 8°C até serem novamente utilizados (Fig. 1 – Tubo fechado).

Os calibradores só podem ser utilizados ao máximo quatro vezes.

Figura 1: Desenho do tubo



Carregamento das amostras

Identificar as amostras utilizando o leitor de código de barras e introduzi-las no analisador, na área respectiva. Em caso de falta do código de barras na amostra ou em caso de falha da leitura, os dados de identificação da amostra podem ser introduzidos manualmente.

Seleccionar os parâmetros requeridos para cada amostra.

Calibração

O *Analisador 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 recalibrar a “master curve” quer em função do analisador utilizado, quer dos reagentes a bordo.

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

Assim que a recalibração 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” recalibrada.

O prazo de validade da “master curve” recalibrada para o kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG* é de 15 dias.

A gestão da recalibração é accionada automaticamente pelo analisador.

Ensaio

Premir o botão de início.

1. O sistema aspira 100 μ L de Diluente de Amostra, 20 μ L de Partículas Magnéticas, 100 μ L de Diluente de Amostra e 6 μ L de amostra, ou controlo para os calibradores, o soro positivo é fornecido pré-diluído com o Diluente de Amostras e o volume aspirado é de 106 μ L). As soluções e a suspensão aspiradas são distribuídas na cuvette de reacção.
2. A cuvette 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 μ L de conjugado na cuvette.
5. A cuvette 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 cuvette é transferida para a câmara de leitura.
7. A quantidade de conjugado ligado à fase sólida, expressa em RLU, é directamente proporcional à concentração de IgG anti- β_2 -Glicoproteína I presente na amostra.
8. Os resultados obtidos são interpolados na curva de calibração e expressos em concentrações.

Se o valor de concentração de uma amostra exceder o limite superior do intervalo de medição a amostra deve ser diluída 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 recalibração antes da repetição do ensaio.

CÁLCULO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Cálculo dos resultados

A concentração dos anticorpos IgG anti- β_2 -Glicoproteína I 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 da 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 β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG é de: 0,0 a 867 UA/mL.

Os valores inferiores a 0,0 UA/mL são valores extrapolados e podem ser indicados como “iguais a 0,0 UA/mL”.

Os valores superiores a 867 UA/mL podem ser indicados como “superiores a 867 UA/mL”, ou a amostra deve ser testada novamente após diluição.

Os resultados das amostras podem ser interpretados do seguinte modo:

(UA/mL)	Interpretação
< 10	A amostra deve ser considerada Negativa pela presença de IgG anti- β_2 -Glicoproteína I
10 a 20	A amostra deve ser considerada duvidosa pela presença de IgG anti- β_2 -Glicoproteína I
> 20	A amostra deve ser considerada Negativa pela presença de IgG anti- β_2 -Glicoproteína I

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 β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG 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 inactivação por calor podem influenciar o resultado do ensaio.

Os anticorpos heterófilos 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 β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG*.

As amostras de doentes que sofrem de doenças hepáticas crônicas, infecções crônicas, colagenopatias e mieloma com hipergamaglobulinemia (concentração de IgG superior a 1800 mg/dL), em alguns casos, podem apresentar valores positivos de anti- β_2 -Glicoproteína I.

VALORES PREVISTOS

Foram analisadas as amostras de 100 pessoas saudáveis para verificar a presença de anticorpos IgG anti- β_2 -Glicoproteína I.

99 amostras deram resultados negativos (uma amostra deu resultado incerto), com um valor médio de 1,5 UA/mL e um desvio padrão de 1,92 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 percentil 95 de população negativa, resultou igual a 3,2 UA/mL com o Lote de reagentes 2.

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

Foram testadas com o kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG* 244 amostras, das quais 68 amostras de doentes com síndrome de anticorpos antifosfolípidos (APS), 46 amostras de doentes com doenças auto-imunes sistêmicas reumáticas (7 conectivites, 15 lúpus eritematoso sistémico, 24 artrites reumatóides), 30 amostras de doentes com diversas patologias infecciosas (5 HIV, 7 HBV, 18 HCV) e 100 amostras de indivíduos normais.

Na população presumivelmente negativa (46 amostras de doentes com doenças auto-imunes sistêmicas reumáticas, 30 amostras de doentes com diversas patologias infecciosas e 100 amostras de indivíduos normais) estudada, 2 amostras deram resultados positivos, 7 incertas e 167 negativas.

- **Especificidade do diagnóstico: 94,9% (167/176)**

Na população presumivelmente positiva (68 amostras de doentes com síndrome de anticorpos antifosfolípidos) estudada, 8 amostras deram resultados negativos, 3 incertos e 57 positivos.

- **Sensibilidade do diagnóstico: 83,8 % (57/68)**

Em função dos resultados da especificidade e da sensibilidade de diagnóstico, a **concordância de diagnóstico é de 91,8%(224/244)**.

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 e a reprodutibilidade do kit ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG foram avaliadas utilizando um protocolo baseado nas directrizes do documento EP5-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

A **precisão** foi calculada analisando os resultados de cinco soros com 20 repetições cada (um negativo e quatro positivos com diferentes concentrações de anti- β_2 -Glicoproteína I IgG) executados com dois lotes de reagentes diferentes na mesma sessão experimental.

A concentração do soro anti- β_2 -Glicoproteína I IgG negativo (N4) deu um resultado compreendido no intervalo de 0,0 a 2,5 UA/mL e de 0,0 a 1,2 UA/mL respectivamente com os Lotes de reagentes 1 e 2.

Na Tabela estão indicados os resultados obtidos com os 4 soros positivos.

Amostra	Reagentes Lote nº	Concentração média (UA/mL)	SD	CV %
P1	1	27,8	1,00	3,6
	2	30,5	0,84	2,8
P2	1	73,2	1,66	2,3
	2	89,3	2,22	2,5
P3	1	141,0	4,57	3,2
	2	155,0	7,43	4,8
P4	1	282,7	14,19	5,3
	2	301,9	15,28	5,1

A **reprodutibilidade** foi calculada analisando os resultados da determinação de cinco soros (um negativo e quatro positivos com diferentes concentrações de anti- β_2 -Glicoproteína I IgG) executada individualmente com dois lotes de reagentes diferentes, em 30 sessões diferentes.

A concentração do soro anti- β_2 -Glicoproteína I IgG negativo (N4) deu um resultado dentro do intervalo de 0,0 a 1,8 UA/mL.

Na Tabela estão indicados os resultados obtidos com os 4 soros positivos.

Amostra	Concentração média (UA/mL)	SD	CV %
P1	31,2	2,48	7,9
P2	92,1	9,64	10,5
P3	158,9	10,85	6,8
P4	313,2	25,84	8,3

Linearidade das Diluições

A precisão das diluições do kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG* foi avaliada utilizando um protocolo baseado nas directrizes do documento EP6-A do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Foram doseadas diluições seriadas de 3 soros de concentração elevada de IgG anti-2-Glicoproteína, diluições executadas com o Diluente de Amostra.

Os resultados deste estudo estão resumidos na tabela seguinte.

Amostra	Factor de diluição	Concentração medida (UA/mL)	Concentração prevista (UA/mL)	Recuperação %
1	1	701,6	-	(100)
	2	334,3	350,8	95,3
	4	162,8	175,4	92,8
	8	92,2	87,7	105,1
	16	45,9	43,9	104,6
	32	23,1	21,9	105,5
2	1	694,1	-	(100)
	2	329,0	347,1	94,8
	4	163,8	173,5	94,4
	8	84,6	86,8	97,5
	16	45,6	43,4	105,1
	32	22,4	21,7	103,2
3	1	250,8	-	(100)
	2	135,8	125,4	108,3
	4	70,3	62,7	112,1
	8	38,5	31,4	122,6

De qualquer modo torna-se necessário sublinhar que alguns 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 β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG*, expressa como **limite de detecção** (*Limit of Detection – LoD*: ou seja a menor quantidade de analito que o método é capaz de medir) foi determinada utilizando um protocolo baseado nas directrizes do documento EP17-A do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e a fórmula para o cálculo $LoD = LoB + C_{\beta} SDs$ (onde LoB representa o valor do "Limit of Blank", SDs o desvio padrão previsto para a distribuição da amostra com mais baixa concentração e C_{β} deriva do percentil 95º da distribuição padrão de Gauss).

Foram utilizadas 4 amostras de baixa concentração de analito, determinadas uma só vez com dois Lotes de reagentes diferentes em 30 sessões diferentes.

O Limite de detecção do kit *ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG* foi igual a 8,1 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

Um estudo baseado nas diretrizes do documento EP7-A2 do CLSI demonstrou que o desempenho do ensaio não é influenciado pela presença na amostra de substâncias potencialmente interferentes, indicadas na tabela seguinte, até à concentração testada.

Substâncias Potencialmente Interferentes	Concentração máxima testada
Bilirrubina livre	20 mg/dL
Bilirrubina conjugada	28 mg/dL
Hemoglobina	1000 mg/dL
Ácidos gordos	3000 mg/dL

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

Especificidade analítica: Reacções cruzadas

Para avaliar as potenciais reacções cruzadas do antígeno, utilizado para sensibilizar as partículas magnéticas, foi conduzido um estudo com 23 amostras, todas com níveis altos de outros auto-anticorpos e negativos a anti- β_2 -Glicoproteína I IgG.

As amostras utilizadas estavam assim subdivididas: SS-A (2), SS-B (2), U1-snRNP (1), Jo-1 (2), Scl-70 (3), Cenp B (2), Histonas (1), Nucleolares (1), Gliadina/t-TG (3), CCP (1), RF (1), dsDNA (2), MPO (1), PR3 (1).

O estudo não demonstrou nenhuma reacção cruzada significativa do antígeno 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 β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG, sendo um método com duas incubações, não sofre esse efeito.

Uma amostra com concentração extremamente elevada (acima do intervalo de medição) de IgG anti- β_2 -Glicoproteína confirmou a ausência de efeito "hook" até à concentração de 1076 UA/mL.

Sensibilidade e Especificidade Relativas

A presença de anticorpos anti- β_2 -Glicoproteína I IgG foi determinada utilizando o kit ZENIT RA β_2 -GLYCOPROTEIN I IgG e um método ELISA disponível no mercado em 226 amostras das quais 60 amostras de doentes com síndrome de anticorpos antifosfolípidos (APS), 41 amostras de doentes com doenças auto-imunes sistémicas reumáticas, 27 amostras de doentes com diversas patologias infecciosas e 98 amostras de indivíduos normais.

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

Concordância relativa 97,3% (220/226).

Sensibilidade relativa 93,0% (53/57).

Especificidade relativa 98,8% (167/169).

BIBLIOGRAFIA

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2006; 4:295-306.
2. Pangborn MC. A new serologically active phospholipids from beef heart. *Proc Soc Exp Biol (NY)* 1941; 48, 484-486.
3. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2, 1211-1214.
4. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJC, et al.. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335, 1544-1547.
5. McNeil HP, Simson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation : β_2 -glicoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87, 4120-4127.
6. Wurm H, Beubler E, Plz E, Holasek A, Kostner G. Studies on the possible function of beta 2 – glycoprotein-I: influence in the triglyceride metabolism in the rat. *Metabolism* 1982; 31, 484-486.
7. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Interaction of beta 2-glycoprotein-I with human blood platelets: influence upon the ADP-induced aggregation. *Thromb Haemost* 1985; 54, 397-401.
8. Nimpf J, Bevers EM, Boman PH, Till U, Wurm H, Kostner GM, et al.. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta 2-glycoprotein-I. *Bioch Biophys Acta* 1986; 884, 142-149.

9. Balasubramanian K, Chandra J, Schroit AJ. Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta(2)-glycoprotein I in macrophage recognition. J Biol Chem 1997; 272, 31113-31117.
10. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RBG, Schouten A, Simmelink M, Derksen RHWM, Kroon J, Gros P. Adhesion mechanism of human β_2 -Glicoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. EMBO J 1999; 18, 5166-5174.
11. Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassi R. Crystal structure of human β_2 -glycoprotein I: implication for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. EMBO J 1999; 18, 6228-6239.
12. Hunt JU, Krilis S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys 281- Cys 288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. J Immunol 1994; 152, 653-659.
13. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K and Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. Lancet, 1990; 336, 177-178.
14. Koike T and Matsuura E. What is the "true" antigen for anticardiolipin antibodies ?. Lancet 1991; 337, 671-672.
15. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Suzuki T, Sumida T, Yasuda T and Koike T. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. J Immunol, 1992; 148, 3885-3891.
16. Viard JP, Amoura Z, and Back JF. Association of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies with lupus-type circulating anticoagulant and thrombosis in systemic anticoagulant and thrombosis in systemic lupus erythematosus. AM J Med, 1992; 93, 181-186.



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

PORTUGAL

Distribuído por

A. Menarini Diagnosticos, 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