

<p style="text-align: center;"><b>REF</b></p> <p style="text-align: center;"><b>41429</b></p>	<p style="font-size: 2em;"><b>ZENIT RA PR3</b></p>		<p style="text-align: center;"><i>Distribuído por</i></p> 
<p><b>INSTRUÇÕES PARA A UTILIZAÇÃO</b></p>		  <p style="text-align: right;"><b>50</b></p>	

## APLICAÇÃO

O teste *ZENIT RA PR3* é um teste imunológico quimiluminescente (CLIA) para a determinação quantitativa, com instrumentação dedicada, *Analísador ZENIT RA*, dos anticorpos específicos de classe IgG dirigidos contra a proteinase 3 (PR3) em amostras de soro ou de plasma humano (EDTA, Heparina).

Esta dosagem é utilizada como auxílio no diagnóstico das vasculites primitivas sistémicas ANCA-associadas, em especial da granulomatose de Wegener (GW).

**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

Os anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA) são auto-anticorpos dirigidos contra os antigénios contidos no citoplasma dos granulócitos e dos monócitos<sup>(1)</sup>. Os ANCA são marcadores serológicos de algumas vasculites necrotizantes dos vasos de calibre pequeno (médio), em especial a granulomatose de Wegener (GW), a poliangiite microscópica (PAM), a glomerulonefrite necrotizante extracapilar pauciimune (GNNEP, uma forma de PAM limitada aos rins) e, em menor percentagem, a síndrome de Churg-Strauss (SCS), frequentemente definidas colectivamente como "vasculites-ANCA-associadas" (VAA)<sup>(2)</sup>.

Numerosas evidências, clínicas ou experimentais, sugerem também um papel patogénico dos ANCA nas VAA, em especial para ANCA-MPO<sup>(3)</sup>.

Através da metódica de padrão de imunofluorescência indirecta (IFI) em neutrófilos humanos normais fixados com etanol absoluto podem ser reconhecidos dois quadros fluoroscópicos principais: C-ANCA e P-ANCA. Com menor frequência podem ser detectados outros dois padrões fluoroscópicos, C-ANCA atípico e ANCA-At, geralmente não associados à presença de uma vasculite idiopática<sup>(4)</sup>.

Nos doentes que sofrem de VAA, os principais alvos antigénicos dos ANCA são a mieloperoxidase (MPO) e a proteinase 3 (PR 3)<sup>(5,6)</sup>.

A MPO é uma enzima com propriedades bactericidas importantes, que exerce, através da catálise de reacções de peroxidação, a formação de produtos tóxicos, tais como HOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radicais do oxigénio. Para além disso, o ácido hipocloroso e os seus metabolitos podem inactivar os inibidores das proteases e, portanto, influir na degradação dos tecidos e na manutenção de um microambiente "inflamatório"<sup>(3)</sup>. A MPO representa cerca de 5% do conteúdo proteico total dos neutrófilos; é um molécula fortemente catiónica constituída por um heterodímero de P.M. ~ 140 kDa.

A PR3 é uma serin-proteáse brandamente catiónica contida nos grânulos primários de granulócitos e monócitos, constituída por 228 aminoácidos e com P.M. 29-31 kDa, dotada de actividade antimicrobiana contra bactérias e fungos. A maior parte das suas funções biológicas depende da actividade proteolítica. Num contexto inflamatório é libertada no exterior da célula, juntamente a outros constituintes dos grânulos e radicais do oxigénio, onde pode degradar o colagénio, os proteoglicanos e outros constituintes do tecido conectivo. Todavia, uma actividade proteolítica excessiva, prolongada ou inadequada, provoca danos no organismo<sup>(3)</sup>. Os ANCA-PR3 interferem com a inibição enzimática da PR3 pelo seu inibidor fisiológico  $\alpha$ 1-antitripsina.

Na maior parte dos casos, o padrão C-ANCA é devido à presença de anticorpos específicos para a PR3, enquanto um quadro P-ANCA pode ser provocado por anticorpos dirigidos contra numerosas proteínas, entre as quais a mais frequente é a MPO. Até hoje, os ANCA dirigidos contra outros componentes citoplasmáticos, diferentes de PR3 e MPO, não têm um significado clínico claro e, portanto, não são úteis para o diagnóstico laboratorial das VAA<sup>(7,8)</sup>.

Após a publicação dos resultados do folheto multicêntrico para a padronização dos métodos para a determinação dos ANCA<sup>(9)</sup>, foram redigidas as Linhas de Guia para a execução correcta e interpretação dos testes ANCA nos doentes com suspeita de vasculite, a consultar para um aprofundamento<sup>(4,10,11)</sup>. Como se deduz com clareza do estudo mencionado, cujos resultados foram mais tarde amplamente confirmados, a determinação correcta dos ANCA usufrui da execução combinada da metódica IFI e da identificação da especificidade antigénica reconhecida, através de sistemas antigénios específicos para os dois antigénios principais MPO e PR3 (métodos ELISA, FEIA, CLIA)<sup>(12,13)</sup>.

A execução combinada das duas metódicas permite obter uma especificidade > 98% mesmo para as patologias de controlo, muito superior à que se pode obter com os testes usados individualmente.

O título dos ANCA relaciona-se, apesar de algumas excepções, com a actividade da doença, portanto para a monitorização dos doentes aconselha-se a utilização de metódicas quantitativas para a dosagem de ANCA-MPO ou de ANCA-PR3<sup>(14)</sup>.

A especificidade dos ANCA (MPO ou PR3) não permite diferenciar as diferentes VAA (GW, PAM, GNNEP, SCS), contudo a presença de P-ANCA/MPO-ANCA tende mais para um diagnóstico de PAM ou de GNNEP, enquanto uma positividade C-ANCA/PR3-ANCA é mais frequentemente associada à GW.

Na GW e na PAM (incluindo a forma limitada aos rins) em fase activa, a prevalência dos ANCA é de 70 a 90%, na SCS os ANCA estão presentes em apenas  $\approx$  40% dos doentes, com a MPO como especificidade antigénica prevalente.

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. Uma requisição adequada (probabilidade elevada pré-teste) permite obter um resultado de utilidade clínica real e reduz significativamente a possibilidade de resultados falsos positivos<sup>(15)</sup>.

Portanto, a pesquisa dos ANCA deveria ser efectuada na presença de uma suspeita clínica fundamentada e um resultado positivo, só por si não é suficiente para o diagnóstico de VAA, deve ser avaliado em combinação com um quadro clínico e histológico.

Na literatura são ocasionalmente assinaladas positividade a ANCA em patologias diferentes das vasculites associadas a ANCA, apesar de não sempre confirmadas por demonstração da especificidade antigénica para MPO ou PR3.

São numerosas as patologias a considerar no diagnóstico diferencial, entre as quais é útil recordar, também pela sua frequência elevada, as patologias infecciosas e, em especial, a endocardite bacteriana subaguda. Apesar de o VPN de um resultado negativo ser geralmente elevado, este não exclui totalmente a possibilidade de uma VAA, sobretudo em doentes com uma evidência clínica forte de vasculite primitiva sistémica<sup>(16)</sup>.

---

## PRINCÍPIO DO MÉTODO

---

O kit *ZENIT RA PR3* para a determinação quantitativa das IgG específicas anti-PR3 utiliza um método imunológico indirecto em dois passos, baseado no princípio da quimiluminescência.

O antígeno específico é utilizado para revestir as partículas magnéticas (fase sólida) e um anticorpo anti-IgG humano 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, aderem à fase sólida.

Durante a segunda incubação, o conjugado reage com os anticorpos anti-PR3 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 activação da reacção de quimiluminescência e medição do sinal luminoso. O sinal criado, exprimido 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 de dosagem: adiciona no recipiente de reacção as amostras, calibradores, controlos, partículas magnéticas, conjugado e soluções de activação da quimiluminescência; separação magnética e lavagem das partículas; medição da luz emitida.

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

---

## MATERIAIS E REAGENTES

---

### *Materiais e reagentes fornecidos*

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

Partículas magnéticas revestidas com antígeno PR3 (proteinase 3) em Tampão Fosfato com proteínas estabilizantes, tensoactivo, Pro-Clin 300 e azida de sódio (< 0,1%) como conservantes.

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

Anticorpo policlonal de cabra anti-IgG humanos, marcado com um derivado do éster de acridínio (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 com soroalbumina bovina, um tensoactivo, um corante azul inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO<sub>4</sub> como conservantes.

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

Soro humano com baixa concentração de anticorpos anti-PR3 IgG em Tampão Fosfato com soroalbumina bovina, um tensoactivo, um corante azul inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO<sub>4</sub> como conservantes.

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

Soro humano com elevada concentração de anticorpos anti-PR3 IgG em Tampão Fosfato com soroalbumina bovina, um tensoactivo, um corante azul inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO<sub>4</sub> 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, específicos para cada lote de produto, 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 do novo DATA DISK.

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-ativação)  
1 frasco de 250 mL de Trigger B (solução de pré-ativação)
- 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 superiores para o fecho dos recipientes 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-PR3.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Os reagentes fornecidos no kit ZENIT RA PR3 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 se contivesse 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 FDA aprovados e resultaram não reactivas pela presença de 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 infectado e manuseado como tal.

Se a embalagem estiver estragada, com derramamento dos reagentes, providenciar à descontaminação da área afectada com uma solução diluída de Hipoclorito de Sódio depois de se ter protegido com dispositivos de protecção individual adequados (bata, luvas, óculos).

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

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 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 instruções 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 montados 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

---

A dosagem deve ser executada em amostras humanas de soro e de plasma (EDTA - Heparina).

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

Se a dosagem for executada mais de 8 horas depois, separar o soro, ou o plasma, do coágulo, dos glóbulos vermelhos e das provetas de separação com gel.

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

Se a dosagem for executada 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 instruções 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 recipiente 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 a respectiva guia 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 por falta de leitura, 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 e dos controlos

Os calibradores e os controlos ZENIT RA estão prontos a usar. Deixar os calibradores e os controlos a temperatura ambiente durante 10 minutos e agitar delicadamente o conteúdo, manualmente ou com um vortex, evitando a formação de espuma. Não inverter o recipiente e não retirar a tampa perfuradora de fecho (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 recipiente será perfurada tornando assim possível a colheita do líquido contido no mesmo. O abaixamento total da tampa perfuradora é assinalado pela simultânea cobertura da faixa vermelha situada na parte superior do rótulo (Fig. 1 – Recipiente selado e Recipiente perfurado).

Se os calibradores, ou os controlos, já tiverem sido utilizados, o recipiente terá a tampa superior (tampa branca) e a faixa vermelha do rótulo estar tapada.

Só devem ser carregados no instrumento os recipientes sem tampa superior (tampa branca) e com a faixa vermelha do rótulo tapada (Fig. 1 – Recipiente perfurado).

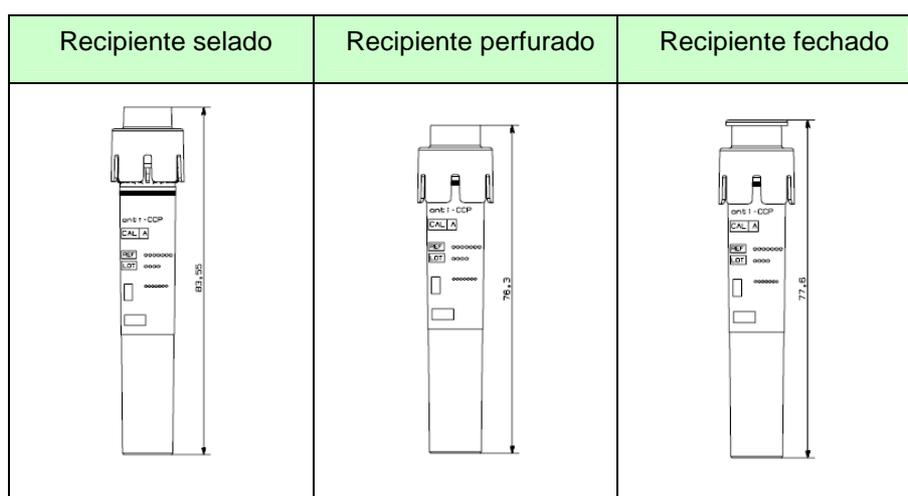
Introduzir no analisador os calibradores, ou os controlos na área das amostras, depois da leitura do código de barras. Os dados do código de barras também podem ser introduzidos manualmente se o rótulo estiver estragado ou em caso de falta de leitura.

Os valores da concentração de anticorpos IgG anti-PR3 presente nos calibradores, ou nos controlos, estão registados no DATA DISK e são transferidos automaticamente para o analisador. Em caso de falta de transferência dos dados, é possível introduzi-los manualmente.

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

Os calibradores só podem ser utilizados ao máximo quatro vezes.

Figura 1: Desenho do recipiente



### Carregamento das amostras

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

Seleccionar os parâmetros requeridos de 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 aos 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 os controlos individualmente. 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 PR3* é de 15 dias.

A gestão da recalibração é accionada automaticamente pelo analisador.

### Dosagem

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 6 µL de amostra, ou controlo (para os calibradores, o soro positivo é fornecido pré-diluído com o Diluente de Amostras e o volume recolhido é de 106 µL). As soluções e a suspensão 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, exprimida em RLU, é directamente proporcional à concentração de IgG anti-PR3 presente na amostra.
8. As respostas obtidas são interpoladas na curva de calibração e transformadas em concentrações.

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

## CONTROLO DE QUALIDADE

---

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

Se o seu laboratório requer, para a verificação dos resultados da dosagem, um uso mais frequente, ou um número mais elevado de controlos, seguir as operações de controlo de qualidade estabelecidas.

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

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

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

Neste caso é necessário executar uma recalibração antes da repetição da dosagem.

## CÁLCULO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

---

### Cálculo dos resultados

A concentração dos anticorpos IgG anti-PR3 presentes nas amostras em exame é calculada automaticamente pelo sistema. Os valores podem ser visualizados no ecrã ou imprimidos.

As concentrações são exprimidas em UA/mL.

O cálculo da concentração na amostra é efectuado através da leitura da resposta obtida por cada amostra numa curva de calibração elaborada com um sistema de “fitting” logístico de quatro parâmetros (4PL, Y ponderado), corrigida periodicamente em função das respostas obtidas na dosagem dos 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 da dosagem ZENIT RA PR3 é de: 0,0 a 1067 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 1067 UA/mL podem ser indicados como “superiores a 1067 UA/mL”, ou testados novamente após a devida 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-PR3
10 a 20	A amostra deve ser considerada duvidosa pela presença de IgG anti-PR3
> 20	A amostra deve ser considerada Positiva pela presença de IgG anti-PR3

---

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

#### LIMITES DA DOSAGEM

---

Para efeitos de diagnóstico, os resultados obtidos com o kit *ZENIT RA PR3* 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 ao calor podem influenciar o resultado da dosagem.

Os anticorpos heterófilos presentes nas amostras de soro humano podem reagir com os reagentes à base de imunoglobulinas, provocando interferências nas dosagens imunológicas *in vitro*. Estas amostras podem dar lugar a valores anormais, se analisados com o kit *ZENIT RA PR3*.

#### VALORES PREVISTOS

---

Foram analisadas as amostras de 99 dadores seleccionados casualmente para verificar a presença de anticorpos IgG anti-PR3.

Todas as amostras analisadas deram resultados negativos, com um valor médio de 1,0 UA/mL e um desvio padrão de 1.239 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 95 por cento de população negativa, resultou igual a 3,5 UA/mL com o Lote de reagentes 1 1.

#### SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

---

Foi testado com o kit *ZENIT RA PR3* um total de 333 amostras das quais 50 amostras de pacientes que sofrem de vasculite primitiva sistémica ANCA-associadas, diagnosticada como granulomatose de Wegener (GW), 45 amostras de doentes que sofrem de vasculite primitiva sistémica ANCA-associada diagnosticada como poliangeioite microscópica (PAM), 109 amostras de doentes que sofrem de várias patologias (14 doenças inflamatórias intestinais crónicas, 44 de lúpus eritematoso sistémico, 7 de conectivites sistémicas, 20 vasculites não ANCA-associadas, 10 artrites reumatóides, 14 patologias infecciosas), 30 amostras de indivíduos normais e 99 amostras de dadores.

Na população presumivelmente negativa (45 amostras de pacientes com diagnóstico PAM, 109 amostras de pacientes que sofrem de várias patologias não ANCA-associadas, 30 amostras de indivíduos normais e 99 amostras de dadores) estudada, 9 amostras deram resultados positivos, 8 duvidosos e 266 negativos.

**- Especificidade do diagnóstico: 94,0% (266/283)**

Das 17 amostras com resultados “não negativos”, 7 pertenciam ao grupo dos doentes com diagnóstico PAM, 9 ao grupo dos doentes que sofrem de patologias diferentes e uma ao grupo dos indivíduos normais. Na população presumivelmente positiva (50 amostras de pacientes com diagnóstico GW) estudada, 11 amostras deram resultados negativos e 39 positivos.

**- Sensibilidade do diagnóstico: 78,0% (39/50)**

Das 11 amostras com resultados “não positivos”: 7 amostras deram resultados positivos ao teste “gold standard” de imunofluorescência indirecta com padrão P-ANCA e 4 amostras deram resultados negativos ao teste “gold standard” de imunofluorescência indirecta (uma das quais mostrava um padrão “atípico”).

Em função dos resultados da especificidade e da sensibilidade de diagnóstico, o **acordo diagnóstico é de 91,6%(305/333)**.

## 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 PR3* foram avaliadas utilizando um protocolo baseado nas linhas guia do documento EP5-A2 dos Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

A **precisão** foi calculada analisando os resultados de 20 repetições de cinco soros (um negativo e quatro positivos com diferentes concentrações de anti-PR3 IgG) executados com dois lotes de reagentes diferentes na mesma sessão experimental.

A concentração do soro anti-PR3 IgG negativo (N2) deu um resultado compreendido no intervalo de 0,0 a 3,0 UA/mL e de 2,1 a 4,4 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	23,0	0,80	3,5
	2	28,5	0,86	3,0
P2	1	70,0	1,83	2,6
	2	80,0	1,68	2,1
P3	1	110,2	3,74	3,4
	2	145,8	2,93	2,0
P4	1	386,7	6,64	1,7
	2	434,6	8,78	2,0

A **reprodutibilidade** foi calculada analisando os resultados da determinação de cinco soros (um negativo e quatro positivos com diferentes concentrações de anti-PR3 IgG) executada individualmente com dois lotes de reagentes diferentes, em 30 sessões diferentes.

A concentração do soro anti-PR3 IgG negativo (N2) deu um resultado dentro do intervalo de 0,0 a 3,8 UA/mL.

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

Amostra	Concentração média (UA/mL)	SD	CV %
P1	24,5	1,56	6,4
P2	71,3	3,09	4,3
P3	124,6	11,05	8,9
P4	391,8	22,87	5,8

#### Linearidade das Diluições

A linearidade das diluições do kit *ZENIT RA PR3* foi avaliada utilizando um protocolo baseado nas linhas guia do documento EP6-A dos Clinical and Laboratory Standards (CLSI).

Foram doseadas diluições escalares de 3 soros de concentração elevada de IgG anti-PR3, executadas com o Diluente de Amostras.

Os resultados deste estudo estão resumidos na tabela seguinte.

Amostra	Factor de diluição	Concentração medida (UA/mL)	Concentração prevista (UA/mL)	Recuperação %
1	1	377,4	-	(100)
	2	186,7	188,7	98,9
	4	84,7	94,4	89,7
	8	37,0	47,2	78,4
2	1	957,1	-	(100)
	2	493,1	478,6	103,0
	4	256,1	239,3	107,1
	8	131,8	119,6	110,2
	16	71,0	59,8	118,7
3	1	206,9	-	(100)
	2	111,6	103,5	107,8
	4	64,0	51,7	123,8
	8	33,4	25,9	129,0

De qualquer modo torna-se necessário sublinhar que nem todos os soros, quando medidos em diluições diferentes, podem dar resultados 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 PR3*, exprimida 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 linhas guia do documento EP17-A dos Clinical and Laboratory Standards (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 pela distribuição da amostra a baixa concentração e  $C_{\beta}$  deriva de 95 por cento 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 PR3* foi igual a 7,3 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 linhas guia do documento EP7-A2 do CLSI demonstrou que os desempenhos da dosagem não são influenciados pela presença na amostra de substâncias potencialmente interferentes, indicadas na tabela seguinte, até à concentração experimentada.

Substâncias Potencialmente Interferentes	Concentração máxima experimentada
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 antigénio, utilizado para sensibilizar as partículas magnéticas, foi conduzido um estudo com 24 amostras, todas com níveis altos de outros auto-anticorpos e negativos a anti-PR3 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),  $\beta$ 2-GPI/CL IgG (2), Gliadina/t-TG (3), CCP (1), RF (1), dsDNA (3). 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 subestimados (Efeito hook).

O método utilizado no kit *ZENIT RA PR3*, sendo um método com duas incubações, não sofre esse efeito.

Uma amostra com concentração extremamente elevada (acima do intervalo de medição) de IgG anti-PR3 confirmou a ausência de efeito "hook" até à concentração de 20831 UA/mL.

#### Sensibilidade e Especificidade Relativas

A presença de anticorpos anti-PR3 IgG foi determinada utilizando o kit *ZENIT RA PR3* e um método de dosagem ELISA à disposição no comércio em 226 amostras: 50 amostras de doentes que sofrem de vasculite primitiva sistémica ANCA-associada diagnosticada como granulomatose de Wegener, 43 amostras de pacientes que sofrem de vasculite primitiva sistémica ANCA-associada diagnosticada como poliangiite microscópica, 103 amostras de doentes que sofrem de patologias diferentes (doenças inflamatórias intestinais crónicas, lúpus eritematoso sistémico, conectivites sistémicas, vasculites não ANCA-associadas, artrite reumatóide, patologias infecciosas) e 30 pacientes normais.

4 amostras deram lugar a resultados divergentes entre a dosagem ZENIT RA e a dosagem ELISA disponível no comércio.

A **concordância relativa** resultou assim igual a 98,2% (222/226).

A **sensibilidade relativa** resultou igual a 97,8% (45/46).

A **especificidade relativa** resultou igual a 98,3% (177/180).

A amostra com resultado negativo com o kit *ZENIT RA PR3* e positivo com o kit ELISA pertencia ao grupo das amostras com lúpus eritematoso sistémico.

As três amostras com resultados positivos com o kit *ZENIT RA PR3* e negativos com o kit ELISA pertenciam: duas ao grupo das amostras com granulomatose de Wegener e uma ao grupo das amostras com poliangiite microscópica.

#### Soro de referência

A quantidade de anticorpos anti-PR3 IgG presentes na amostra "PR3-ANCA HUMAN REFERENCE SERUM # 16" (CDC, Cat. Nº IS2721, Lote. Nº 07-0001), testada com o kit *ZENIT RA PR3*, após a devida diluição, resultou ser igual a 2282 UA/mL.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Wiik A. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 97 ( Suppl 6 ) : S12-S13, 1989.
2. Jennette JC, Falk RJ. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and associated diseases : a review. Am J Kidney Dis 1990; 15 : 517-29.
3. Chen M, Kallenberg CGM. New advantages in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. Clin Exp Rheumatol 2009, 27( s.52 ): 108-14. Review.

4. Savige J, Gillis D, Benson E, et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 507-13.
5. Sinico RA, Radice A, Pozzi C, et al. Diagnostic significance and antigen specificity of antineutrophil cytoplasmic antibodies in renal disease : a prospective multicentre study. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9 : 505-10.
6. Radice A, Sinico RA. Antineutrophil cytoplasmic antibodies ( ANCA ). *Autoimmunity* 2005;38: 93-103.
7. Vecchi M, Bianchi MB, Sinico RA, Radice A, et al. Antibodies to neutrophil cytoplasm in Italian patients with ulcerative colitis : sensitivity,specificity and recognition of putative antigens. *Digestion* 1994 ; 55: 34-9.
8. Merkel PA, Polisson RP, Chang YC, Skates SJ, et al. Prevalence of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in a Large Inception Cohort of Patients with Connective Tissue Disease. *Ann Int Med* 1997; 126: 866-73.
9. Hagen EC, Daha MR, Andrassy K, Csernok E, et al for the EC/BRC Project for ANCA Assay Standardization. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. *Kidney Int* 1998; 53: 743-53.
10. Sinico RA, Radice A, Tonutti E, Villalta D, et al per il gruppo FIRMA. Proposta di linee guida per la determinazione degli anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili ( ANCA ). *Riv Med Lab-JLM* 2002; 3 (4): 20-24.
11. Savige J, Dimech W, Fritzier M, et al for the International Group for Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies ( ANCA ). Addendum to the International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies: quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 312-18.
12. Jennette JC,Wilkman AS, Falk RJ. Diagnostic predicting value of ANCA serology. *Kidney Int* 1998; 53: 796-8.
13. Schmitt WH, van der Woude FJ. Clinical Applications of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody Testing. *Curr Opin Rheumatol* 2004 ; 16(1): 9-17.
14. Sinico RA, Radice A, Corace C, Di Toma L, Sabadini E. Value of a New Automated Fluorescence Immunoassay ( ELIA ) for PR3 and MPO-ANCA in Monitoring Disease Activity in ANCA-Associated Systemic Vasculitis. *Ann NY Acad Sci* 2005;1050: 185-92.
15. Mandl LA, Solomon DH, Smith EL, Lew RA, Katz JN, Shmerling RH. Using antineutrophil cytoplasmic antibody testing to diagnose vasculitis : can test-ordering guidelines improve diagnostic accuracy ? *Arch Inter Med* 2002; 162:1509-14.

16. Radice A, Sinico RA. La diagnosi clinica e di laboratorio delle malattie autoimmune sistemiche: le vasculiti. In: Il Laboratorio nelle Malattie Reumatiche Autoimmuni, R Tozzoli, N Bizzaro, D Villalta, E Tonutti, Ed. Aesculapio 2007.



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

**Distribuído por**

**A. Menarini Diagnosticos, Lda**

Quinta da Fonte - Edifício D. Manuel I, 2ºB

2770-203 Paço de Arcos

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

[www.menarinidiag.pt](http://www.menarinidiag.pt)