


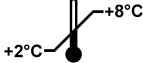




REF 41418 	ZENIT RA Scl-70		Distribuído por: 
INSTRUÇÕES PARA A UTILIZAÇÃO		  50	

APLICAÇÃO

O teste *ZENIT RA Scl-70* é um teste imunológico quimioluminescente (CLIA) para a determinação quantitativa, com instrumentação dedicada, *Analizador ZENIT RA*, dos anticorpos específicos de classe IgG dirigidos contra o antígeno Scl-70 (ADN topoisomerase I) em amostras de soro ou de plasma humano (EDTA).

Este ensaio é utilizado como técnica de diagnóstico suplementar na avaliação das doenças auto-imunes sistêmicas reumáticas.

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 auto-anticorpos anti-antígenos nucleares extraíveis (ENA) representam uma grande família de auto-anticorpos não-órgãos e não-espécies-específicos cuja detecção é de grande importância no diagnóstico laboratorial das doenças auto-imunes sistêmicas reumáticas^(1,2,3,4).

As doenças auto-imunes sistêmicas caracterizam-se, do ponto de vista laboratorial, pela presença de auto-anticorpos anti-núcleo (ANA). Os ANA são o primeiro teste auto-anticorpos a pedir para o doente com suspeita de patologia auto-imune sistémica. Em geral, a pesquisa dos ANA executa-se com o método de imunofluorescência indirecta (IFI) numa camada única de células HEp-2; a positividade por ANA em IFI indica a presença de auto-anticorpos dirigidos contra diferentes antígenos nucleares (ADN, histonas, proteínas não histónicas, antígenos nucleolares, etc.) ou citoplasmáticos^(5,6). A positividade dos ANA, a título significativo, deve ser aprofundada com a pesquisa dos auto-anticorpos anti-ENA e anti-dsADN. A verificação de positividade dos ANA e de uma ou mais especificidades para anti-ENA e/ou para anti-dsADN é extremamente sugestiva de patologias auto-imunes sistémicas: lúpus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjogren (SS), esclerose sistémica progressiva (SSp), dermatomiosite-polimiosite (DM/PM) e doença mista do tecido conectivo (MCTD).

Os anticorpos anti-topoisomerase I ou anti-Scl70 representam, juntamente aos anti-centrómero (ACA) e aos anti-RNA polimerase III (RNAP), os auto-anticorpos detectados com maior frequência no soro de doentes com esclerose sistémica (SSc)^(7,8,9,10). A SSc diferencia-se em forma localizada e em forma sistémica⁽¹¹⁾; a forma sistémica pode por sua vez distinguir-se em forma limitada (lcSSc) e em forma difusa (dcSSc)^(11,12). Os anticorpos anti-Scl70 são os associados com maior frequência com a dcSSc.

A topoisomerase I é uma enzima, cuja função é a de modificar a superestrutura do ADN nativo. A topoisomerase I é um polipeptido de 765 AA localizado no nucleoplasma, no nucléolo e nos cromossomas⁽¹³⁾. Na molécula foram evidenciados pelo menos 6 epítomos imunodominantes, 2 dos quais reconhecidos pela maior parte dos auto-anticorpos presentes nos soros dos doentes⁽¹⁴⁾.

Os anti-Scl70 são constituídos por IgG de todas as subclasses⁽¹⁵⁾, por IgA e, com menos frequência, por IgM⁽¹⁶⁾ e estão presentes em 20 a 40% dos doentes com SSc. A associação entre dcSSc, presença de anti-Scl70 e DRB1*11, representa um factor de risco elevado pelo esforço pulmonar na doença⁽¹⁷⁾. Os doentes com anti-Scl70 apresentam um prognóstico mais grave da doença pela frequente associação com insuficiência cardíaca secundária aos danos pulmonares⁽¹⁸⁾. A especificidade destes auto-anticorpos é próxima dos 100% assumindo um papel fundamental no diagnóstico de SSc.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O kit *ZENIT RA Scl-70* para a determinação quantitativa das IgG específicas anti-Scl-70 utiliza um método imunológico indirecto em dois passos, baseado no princípio da quimioluminescência.

O antigénio específico é utilizado para revestir as partículas magnéticas (fase sólida) e um anticorpo anti-IgG humano este 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-Scl-70 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 cuvete 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 antigénio Scl-70 em tampão fosfato com proteínas estabilizantes, 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 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-Scl-70 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-Scl-70 IgG em tampão fosfato com soroalbumina bovina, tensoactivo, 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 *
Embalagem de 960 cuvetes. | Cód. nº 41402 |
| - ZENIT RA System Liquid *
1 garrafa de 0,5 litros de solução 10x. | Cód. nº 41409 |
| - ZENIT RA Wash Solution *
1 garrafa de 0,5 litros de solução 20x. | Cód. nº 41407 |
| - ZENIT RA Trigger Set *
1 frasco de 250 mL de Trigger A (solução de pré-activação)
1 frasco de 250 mL de Trigger B (solução de pré-activação) | Cód. nº 41403 |
| - ZENIT RA D-SORB Solution
Embalagem de 2 garrafas de 1 litro de solução pronta a usar. | Cód. nº 41436 |
| - ZENIT RA Cartridge Checking System * | Cód. nº 41401 |
| - ZENIT RA Top Cap Set
300 tampas externas para tapar os tubos dos calibradores após a primeira utilização. | Cód. nº 41566 |

(*) 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 ANA CONTROL SET | Cód. nº 41448 |
| 3 ampolas de 1,5 mL de soro humano negativo e 3 ampolas de 1,5 mL de soro humano positivo para anticorpos anti-Scl-70. | |

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Os reagentes fornecidos no kit *ZENIT RA Scl-70* 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).

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 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 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 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 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).

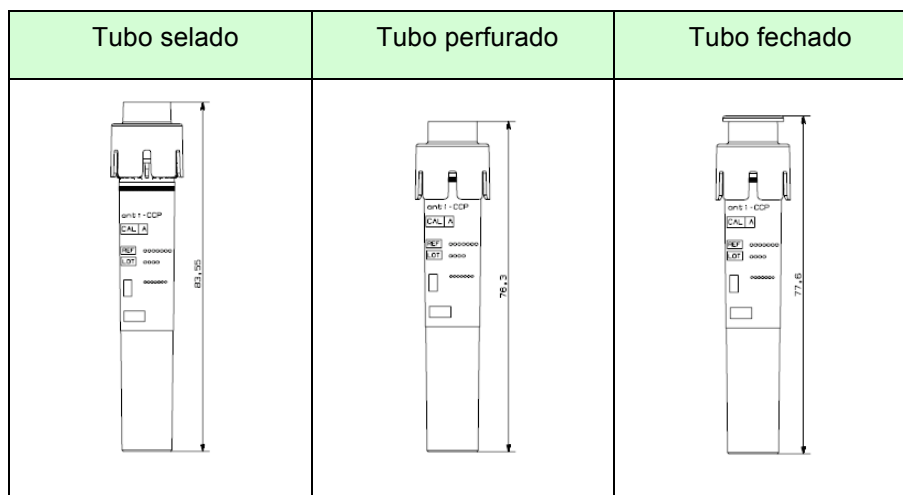
Introduzir no analisador os calibradores ou os controlos na área das amostras, depois da leitura do código de barras. Os dados do código de barras também podem ser introduzidos manualmente se o rótulo estiver estragado ou em caso de falha da leitura.

Os valores da concentração de anticorpos IgG anti-Scl-70 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 recipientes 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 de 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 por 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 ScI-70* é de 15 dias.

A gestão da recalibração é accionada automaticamente pelo analisador.

Ensaio

Premir o botão de início.

1. O sistema aspira 80 µL de Diluente de Amostra, 40 µL de Partículas Magnéticas, 100 µL de Diluente de Amostra e 4 µL de amostra, ou controlo (para os calibradores, o soro positivo é fornecido pré-diluído com o Diluente de Amostra e o volume aspirado é de 104 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, expressa em RLU, é directamente proporcional à concentração de IgG anti-Scl-70 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 recalibração antes da repetição do ensaio.

CÁLCULO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Cálculo dos resultados

A concentração dos anticorpos IgG anti-Scl-70 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 Scl-70* é de: 0,0 a 640 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 640 UA/mL podem ser indicados como “superiores a 640 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-Scl-70
≥ 10	A amostra deve ser considerada Positiva pela presença de IgG anti-Scl-70

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 Scl-70* 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 Scl-70*.

VALORES PREVISTOS

Foram analisadas as amostras de 100 dados seleccionados casualmente para verificar a presença de anticorpos IgG anti-Scl-70.

Todas as amostras analisadas deram resultados negativos, com um valor médio de 1,1 UA/mL e um desvio padrão de 0,84 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 da população negativa, deu como resultado 3,7 UA/mL com o Lote de reagentes 2. 1.

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 Scl-70* 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 quatro soros com 20 repetições cada (um negativo e três positivos com diferentes concentrações de anti-Scl-70 IgG) executados com dois lotes de reagentes diferentes na mesma sessão experimental.

A concentração do soro anti-Scl-70 IgG negativo (NC) deu um resultado compreendido no intervalo de 0,0 a 0,6 UA/mL e de 0,2 a 0,8 UA/mL respectivamente com o Lote de reagentes 1 e 2 2.

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

Amostra	Reagentes Lote nº	Concentração média (UA/mL)	SD	CV %
LP	1	18,0	0,52	2,9
	2	16,4	0,57	3,5
MP	1	76,0	3,39	4,5
	2	77,2	7,34	9,5
HP	1	222,2	9,09	4,1
	2	231,5	8,00	3,5

A **reprodutibilidade** foi calculada analisando os resultados da determinação de quatro soros (um negativo e três positivos com diferentes concentrações de anti-Scl-70 IgG) executada individualmente com dois lotes de reagentes diferentes, em 30 sessões diferentes.

A concentração do soro anti-Scl-70 IgG negativo (N1) deu um resultado dentro do intervalo de 0,0 a 0,6 UA/mL.

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

Amostra	Concentração média (UA/mL)	SD	CV %
LP	17,4	1,06	6,1
MP	77,9	5,57	7,2
HP	211,6	18,44	8,7

Linearidade das Diluições

A linearidade das diluições do kit *ZENIT RA Scl-70* foi avaliada utilizando um protocolo baseado nas directrizes do documento EP6-A do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Foram testadas diluições seriadas de 2 soros de concentração elevada de IgG anti-Scl-70, 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	197,7	-	(100)
	2	100,2	98,9	101,3
	4	49,0	49,4	99,2
	8	22,6	24,7	91,5
2	1	148,3	-	(100)
	2	72,6	74,2	97,8
	4	35,1	37,1	94,6
	8	17,6	18,5	95,1

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 Scl-70*, 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 95 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 Scl-70* foi igual a 5,0 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 directrizes 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 antigénio, utilizado para sensibilizar as partículas magnéticas, foi conduzido um estudo com 13 amostras, todas com níveis altos de outros auto-anticorpos e negativos para anti-Scl-70 IgG.

As amostras utilizadas estavam assim subdivididas: dsADN (1), Cenp B (2), Histonas (1), Nucleolares (1), β 2-GPI/CL IgG (1), Gliadina/t-TG (3), RF (2), MPO (1) e PR3 (1).

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 Scl-70*, sendo um método com duas incubações, não sofre esse efeito.

Uma amostra com concentração extremamente elevada (acima do intervalo de medição) de IgG anti-Scl-70 confirmou a ausência de efeito "hook" até à concentração de 3010 UA/mL.

Sensibilidade e Especificidade Relativas

A presença de anticorpos anti-Scl-70 IgG foi determinada utilizando o kit *ZENIT RA Scl-70* e um método ELISA disponível no mercado, em 422 amostras. 2 amostras deram origem a resultados divergentes entre o ensaio ZENIT RA e o método ELISA disponível no mercado.

Concordância relativa: 99,5% (420/422).

Sensibilidade relativa: 100,0% (23/23).

Especificidade relativa: 99,5% (397/399).

Soro de referência

A quantidade de anticorpos anti-Scl-70 IgG presentes na amostra "ANA HUMAN REFERENCE SERUM # 9" (CDC, Cat. n° IS2135, Lote n° 84-0027) medida com o kit *ZENIT RA Scl-70* foi de 405 UA/mL.

BIBLIOGRAFIA

1. CA von Mühlen, EM Tan. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Sem Arthr Rheum* 1995; 24: 323-58.
2. RL Humbel. Auto-immunité, auto-anticorps et maladie. In : Humbel RL, ed. *Autoanticorps et maladies autoimmunes*, Paris, France : Edition Scientifiques Elsevier; 1997: 17-20.
3. PN Hollingsworth, SC Pummer, RL Dawkins. Antinuclear antibodies. In : Peter JB, Shoenfeld Y, eds. *Autoantibodies*. Amsterdam, The Netherlands : Elsevier Science BV; 1996: 74-90.
4. CA Slater, RB Davis, RH Shmerling. Antinuclear antibodies testing. A study of clinical utility. *Arch Int Med* 1996; 156: 1421-5.
5. RL Humbel. Detection of antinuclear antibodies by immunofluorescence. In : van Venrooij, Maini RN eds. *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, the Netherlands : Kluwer; 1993: A2:1-16.
6. National Committee for clinical Laboratory Standarditation. Quality assurance for the indirect immunofluorescence test for autoantibodies to nuclear antigen (IF-ANA). Approved guideline. Wayne, PA: NCCLS I/LA2-A, vol 16(11); 1996.
7. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23 : 581-90.

8. HJ Lakomek, HH Guldner, FA Bautz, G Goerz, P Kind, M Mensing, et al. Nuclear antibodies as serologic markers in progressive systemic scleroderma. *Hautarzt* 1987; 38: 63-9.
9. CC Bunn, CP Denton, X Shi-Wen, C Knight, CM Black. Anti-RNA polymerases and other autoantibody specificities in systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 15-20.
10. D Vazquez-Abad, NF Rothfield. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995; 12: 145-57.
11. EC Le Roy, T Krieg, C Black, TA Jr Medsger, R Fleischmajer, N Rowell, et al. Scleroderma (Systemic Sclerosis) : classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15 : 202-5.
12. RL Humbel. Auto-immunité, auto-anticorps et maladie auto-immunes. In : Humbel RL, ed. *Autoanticorps et maladies autoimmunes*, Paris: Elsevier 1997. pp 71-3.
13. P D'Arpa, PS Machlin, H Ratie, NF Rothfield, DW Cleveland, WC Earnshaw. cDNA cloning of human topoisomerase I. Catalytic activity of a 67.7 kDa carboxyl-terminal fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988.; 85: 2543-7.
14. P D'Arpa, H White-Cooper, DW Cleveland, NF Rothfield, WC Earnshaw. Use of molecular cloning methods to map the distribution of epitopes on topoisomerase I (Scl-70) recognized by sera of scleroderma patients. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1501-11.
15. C Bona, N Rothfield. Autoantibodies in scleroderma and tightskin mice. *Curr Opin immunol* 1994; 6: 931-7.
16. D Vazquez-Abad, CA Russell, SM Cusick, WC Earnshaw, NF Rothfield. Longitudinal study of anticentromere and antitopoisomerase I isotypes. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 74: 257-70.
17. GC Fanning, KI Welsh, C Bunn, A Du Bois, CM Block. HLA association in three mutually exclusive autoantibody subgroups in UK systemic sclerosis patients. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 201-7.
18. D Basu, JD Reveille. Anti-Scl-70. *Autoimmunity* 2005; 38: 65-72.



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

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