



COD 44704 96 Determinações
CONSERVAR A 2-8°C
Reagentes para a determinação de anticorpos antigliadina Só para uso <i>in vitro</i> em laboratório clínico

ANTICORPOS ANTIGLIADINA

Enzimoimunoanálise
PROVA NA MICROPLACA

FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os anticorpos antigliadina presentes no soro unem-se ao antígeno adsorvido à superfície dos poços da microplaca. A continuação, incubase com os anticorpos antiIgA humana ou antiIgG humana conjugados com peroxidase. Finalmente, acrescenta-se o cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) com H₂O₂, substrato que proporciona um produto solúvel de cor amarela. A reação enzimática é detida com ácido e a formação de produto mede-se a 450 nm. A concentração de anticorpos antigliadina na amostra é proporcional à absorvância do produto formado¹.

CONTEÚDO E COMPOSIÇÃO

- A. Tampão de Lavagem Concentrada.** 50 mL. Tampão fosfatos 0,6 mol/L, detergente não iónico 6 g/L, azida de sódio 15 mmol/L, pH 7,6.
- B. Diluente de Amostra.** 100 mL. Tampão fosfatos 30 mmol/L, cloreto de sódio 0,3 mol/L, albumina bovina 5 g/L, detergente não iónico 0,5 g/L, azida de sódio 15 mmol/L, pH 6,7. Corado azul.
- C+. Controlo Positivo IgA.** 1 mL. Pronto para ser utilizado. Soro com anticorpos antigliadina tipo IgA, azida de sódio 15 mmol/L.
- C+. Controlo Positivo IgG.** 1 mL. Pronto para ser utilizado. Soro com anticorpos antigliadina tipo IgG, azida de sódio 15 mmol/L.
- C-. Controlo Negativo.** 2 mL. Soro humano negativo para anticorpos antigliadina, azida de sódio 15 mmol/L.
- DA. Conjugado IgA.** 12 mL. Antiimunoglobulina A humana conjugada com peroxidase. Corado verde.
- DG. Conjugado IgG.** 12 mL. Antiimunoglobulina G humana conjugada com peroxidase. Corado amarelo.
- E. Substrato.** 12 mL. 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- F. Solução de Paragem.** 15 mL. Ácido sulfúrico 0,5 mol/L.
PERIGO: H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. P303+P361+P353: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): despir/retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche.
- M. Microplaca.** 96 poços separáveis individualmente recobertos com gliadina.
- S1A-S6A. Padrões Antigliadina IgA,** calibrados frente a um padrão de referência interno. 1 mL, prontos para serem utilizados. Soro antigliadina, azida de sódio 15 mmol/L. As concentrações de anticorpos antigliadina tipo IgA são 0, 25, 50, 100, 150 e 200 U/L, conforme o indicado na etiqueta.
- S1G-S6G. Padrões Antigliadina IgG,** calibrados frente a um padrão de referência interno. 1 mL, prontos para serem utilizados. Soro antigliadina, azida de sódio 15 mmol/L. As concentrações de anticorpos antigliadina tipo IgG são 0, 10, 20, 50, 100 e 200 U/L, conforme o indicado na etiqueta.

Para mais advertências e precauções, ver a ficha de dados de segurança do produto (SDS).

Os soros humanos utilizados na preparação dos padrões, do controlo negativo e do controlo positivo eram negativos para o antígeno HBs e para os anticorpos anti-HCV e anti-HIV. No entanto, os padrões e os controlos devem ser tratados com precaução como potencialmente infecciosos.

CONSERVAÇÃO

Conservar a 2-8°C.

Os componentes são estáveis até à data de caducidade indicada na etiqueta sempre que se conservem bem fechados e se evite a contaminação durante o seu uso.

Indicações de deterioração:

- Reagentes: Presença de partículas, turvação.
- Microplaca: Roturas no pacote contentor, defeitos macroscópicos como raladuras na base do poço.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão de Lavagem. Efectuar uma diluição 1/25 do Tampão de Lavagem Concentrada (A) com água destilada e misturar. Necessitam-se aproximadamente 50 mL de Tampão de Lavagem para a lavagem de uma tira. Uma vez diluído, o reagente é estável 7 dias a 2-8°C.

Os outros componentes estão prontos para serem utilizados.

EQUIPAMENTO ADICIONAL

- Câmara húmida
- Aspirador multicanal ou lavagem automática de microplacas
- Leitor de microplacas ou fotómetro com microcuvete e filtro de 450 ± 10 nm

AMOSTRAS

Soro ou plasma recolhidos através de procedimentos standard. Estável 1 semana a 2-8°C.

Diluir as amostras 1/400 no Diluente da Amostra (B) antes do ensaio.

PROCEDIMENTO

1. Temperar os componentes do kit à temperatura ambiente (Nota 1).
2. Abrir a bolsa da microplaca e retirar a quantidade necessária de poços (Nota 2).
3. **Determinação:**
 - **Quantitativa:** Pipetar 100 µL de cada um dos padrões (S1-S6), Controlo Positivo (C+), Controlo Negativo (C-) e amostras diluídas em diferentes poços.
 - **Qualitativa:** Pipetar 100 µL de Controlo Positivo (C+), Controlo Negativo (C-) e amostras diluídas em diferentes poços. Pipetar 100 µL do Diluente de Amostra (B) para o branco.
4. Incubar os poços durante 30 minutos na câmara húmida à temperatura ambiente.
5. Aspirar o líquido e lavar os poços com 300 µL de Tampão de Lavagem durante uns 10 segundos 4 vezes (Notas 3 e 4).
6. Pipetar 100 µL de Conjugado (DA ou DG) em cada um dos poços.
7. Incubar os poços como no passo 4.
8. Lavar como no passo 5.
9. Pipetar 100 µL de Substrato (E) em cada um dos poços.
10. Incubar as tiras durante 15 minutos à temperatura ambiente na câmara húmida.
11. Pipetar 100 µL de Solução de Paragem (F) em cada um dos poços (Nota 5).
12. Medir a absorvância do conteúdo de cada poço a 450 nm usando o Padrão 0 UI/mL (S1) ou o branco para o ajuste a 0. A cor é estável durante ao menos 30 minutos.

CÁLCULOS

Determinação quantitativa. Representar graficamente os valores de absorvância obtidos para os Padrões frente às suas respectivas concentrações de anticorpos antigliadina (U/L). A concentração de anticorpos antigliadina na amostra é calculada por interpolação na curva de calibração (curvas recomendadas: 4-parametric logistic, cubic spline, one site-hyperbola).

Determinação qualitativa. Calcular a absorvância do Valor Discriminante aplicando a seguinte fórmula:

$$A_{450\text{ nm}} \text{ Valor Discriminante} = A_{450\text{ nm}} \text{ Controlo Positivo} \times 0,18 \text{ (IgA)}$$

$$A_{450\text{ nm}} \text{ Valor Discriminante} = A_{450\text{ nm}} \text{ Controlo Positivo} \times 0,36 \text{ (IgG)}$$

Calcular a razão de absorvâncias aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{Razão de absorvância} = \frac{A_{450\text{ nm}} \text{ da Amostra}}{A_{450\text{ nm}} \text{ do Valor Discriminante}}$$

Quando forem obtidos valores de absorvância acima do limite superior da escala do leitor de microplacas, diluir a amostra com o Diluente de Amostra (B) e repetir a operação.

VALORES DE REFERÊNCIA

Consideram-se positivas as amostras com concentrações superiores a 18 U/L para IgA e 24 U/L para IgG, ou com razão de absorvância superior a 1,1.

Consideram-se negativas as amostras com concentrações inferiores a 12 U/L para IgA e 16 U/L para IgG, ou com razão de absorvância inferior a 0,9.

As amostras com concentrações compreendidas entre 12 e 18 U/L para IgA, e entre 16 e 24 U/L para IgG, ou com razões compreendidas entre 0,9 e 1,1 devem ser consideradas duvidosas e recomenda-se a repetição do ensaio ou a determinação de parâmetros alternativos de valor diagnóstico.

Estes valores ocorrem a título orientativo. É recomendável que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência.

CONTROLO DE QUALIDADE

A concentração dos Controlos Positivos tanto IgA como IgG deve estar compreendida entre 80 e 120 U/L e a do Controlo Negativo deve ser inferior a 12 U/L para IgA e 16 U/L para IgG.

A razão de absorvância para o Controlo Positivo deve ser superior a 1,1 e para o Controlo Negativo deve ser inferior a 0,9.

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio programa de Controlo de Qualidade interno, assim como procedimentos de correcção no caso dos controlos não cumprirem com as tolerâncias aceitáveis.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

– Repetitividade (intra-ensaio):

U/L IgA	CV %	n
20	5,6	25
76	12,4	25

U/L IgG	CV%	n
45	9,0	25
83	10,5	25

– Reprodutibilidade (interensaio):

U/L IgA	CV %	n
20	5,7	25
76	9,2	25

U/L IgG	CV%	n
45	8,1	25
83	15,2	25

- Limite de detecção: 0,5 U/L (IgA) – 0,2 U/L (IgG)
- Intervalo de medição: 0,5 - 200 U/L (IgA) e 0,2 - 200 U/L (IgG). Quando forem obtidos valores superiores, diluir a amostra com Diluente de Amostra (B) e repetir a medição.
- Veracidade: Os resultados obtidos com estes reagentes não mostram diferenças sistemáticas significativas ao serem comparados com os reagentes de referência. Os detalhes do estudo comparativo estão disponíveis através de solicitação.
- Interferências: A hemólise (hemoglobina < 500 mg/dL), a lipemia (triglicéridos < 1625 mg/dL), a bilirrubina (< 30 mg/dL) e o factor reumatóide (< 300 UI/mL) não interferem. Outras substâncias e medicamentos podem interferir².

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

A determinação de anticorpos por ensaio imunoenzimático anti-gliadina mostra uma grande heterogeneidade na sensibilidade e na especificidade para a doença celíaca, dependendo do estudo e da população³. Em geral, a sensibilidade é de 80-90 % para os anticorpos do tipo IgA, e de 70-100 % para os do tipo IgG. Quanto à especificidade, na maioria dos estudos também varia de 80-90 % para anticorpos IgA e de 70-90 % para anticorpos IgG³.

O diagnóstico clínico não deve ser realizado considerando o resultado de um único ensaio, senão que deve integrar os dados clínicos e de laboratório.

NOTAS

1. Não trocar componentes de kits procedentes de lotes diferentes.
2. Guardar os vasos por utilizar na bolsa bem fechada e com a saqueta dessecante no interior durante 12 meses, no máximo.
3. Ter cuidado de não arranhar a superfície interior dos poços durante todo o procedimento.
4. É importante não deixar restos do Tampão de Lavagem nos poços.
5. A Solução de Paragem (F) detém a reacção enzimática, por isso deve ser pipetada nos poços seguindo a mesma ordem e nos mesmos intervalos de tempo com que foi iniciada a reacção pipetando o Substrato (E) no passo 9.

BIBLIOGRAFIA

1. Butler JE. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
3. Rostom A, Dubé C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garrity C, Sampson M, Zhang L, Yazdi F, Mamaladze V, Pan I, MacNeil J, Mack D, Patel D, Moher D. The Diagnostic Accuracy of Serologic Tests for Celiac Disease: A Systematic Review. Gastroenterology 2005;128: S38-S46.