



COD 44520 48 determinações	COD 44524 96 determinações
COD 44521 12 x 	COD 44525 12 x 
CONSERVAR A 2-8°C	
Reagentes para a determinação dos anticorpos antimúsculo liso Só para uso <i>in vitro</i> no laboratório clínico	

## ANTI-SMOOTH MUSCLE ANTIBODIES (ASMA)



## ANTICORPOS ANTIMÚSCULO LISO (ASMA)

ESTÔMAGO DE RATO

### FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os anticorpos antimúsculo liso (ASMA) do soro unem-se aos seus correspondentes antígenos presentes num corte de estômago de rato. Uma vez unidos, os anticorpos manifestam-se por meio de incubação com um anticorpo contra as imunoglobulinas humanas conjugado com fluoresceína e são visualizados por microscopia de fluorescência<sup>1</sup>.

### CONTEÚDO

	COD 44520	COD 44524
A. Lâminas	12 x 4 poços	12 x 8 poços
B. PBS (20x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. Controlo Positivo ASMA	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
C-. Controlo Negativo	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
D. FITC/Evans (R)	1 x 2,5 mL	2 x 2,5 mL
E. Meio de Montagem	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Papel absorvente	1 x 12	1 x 12

	COD 44521	COD 44525
A. Lâminas	12 x 4 poços	12 x 8 poços

### COMPOSIÇÃO

- A. Lâminas: Cortes de estômago de rato (RS) em cada poço.
- B. PBS (20x): Fosfato de sódio 225 mmol/L, fosfato de potássio 60 mmol/L, cloreto sódico 2,3 mol/L, azida de sódio 0,95 g/L, pH 7,2.
- C+. Controlo Positivo ASMA: Soro humano com anticorpos antimúsculo liso (ASMA), azida de sódio 0,95 g/L.
- C-. Controlo Negativo: Soro humano, azida de sódio 0,95 g/L.
- D. FITC/Evans (R): Anticorpos de cabra antiimunoglobulinas humanas conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e adsorvidos com soro de rato, azul de Evans 0,01 g/L, azida de sódio 0,95 g/L.
- E. Meio de Montagem: Glicerol 78%, fosfato de sódio 6 mmol/L, fosfato de potássio 1,6 mmol/L, cloreto de sódio 60 mmol/L, azida de sódio 0,95 g/L.
- F. Papel absorvente.

Os soros humanos utilizados na preparação do controlo negativo e do controlo positivo eram negativos para o antígeno HBs e para os anticorpos antiHCV e antiHIV. Não obstante, os controlos devem ser tratados com precaução como potencialmente infecciosos.

### CONSERVAÇÃO

Conservar a 2-8°C.

Os reagentes 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:

- Componentes líquidos: Presença de partículas, turvação.
- Lâminas: Rupturas no pacote contenedor, defeitos macroscópicos como raladuras ou descolagens no corte do tecido.

### REAGENTES AUXILIARES

- Cod 44520 e 44524 não precisam de reagentes auxiliares.
- Cod 44521 e 44525 precisam dos seguintes reagentes auxiliares que podem ser adquiridos separadamente:
  - B. PBS (20x) (cod 44592)
  - D. FITC/Evans (R) (cod 44590)
  - E. Meio de Montagem (cod 44694)

### PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

PBS: Efectuar uma diluição 1/20 do Reagente B com água destilada. Estável 1 semana a 2-8°C.

Os outros componentes estão prontos a utilizar.

### EQUIPAMENTO ADICIONAL

- Câmara húmida
- Cuvete de lavagem
- Lamelas de 24 x 60 mm
- Microscópio de fluorescência equipado com filtros de excitação de 495 nm e de emissão de 525 nm para a visualização do FITC.

### AMOSTRAS

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

Diluir as amostras 1/20 em PBS (ver a Preparação dos Reagentes) antes do ensaio.

Para a titulação de uma amostra positiva, realizar diluições duplas em PBS a partir da 1/20.

### PROCEDIMENTO

- Temperar os reagentes e as amostras à temperatura ambiente.
- Depositar uma gota (50 µL) da amostra diluída ou dos Controlos nos poços das lâminas, tentando cobrir perfeitamente (Nota 1).
- Incubar as lâminas em câmara húmida durante 30 minutos à temperatura ambiente (15-30°C).

- Eliminar as gotas das amostras inclinando as lâminas e dar pequenos golpes suavemente. Evitar a mistura dos soros.
- Eliminar o soro restante nas lâminas lavando com PBS (ver a preparação do Reagente). (Nota 2).
- Lavar as lâminas submergindo-as numa cuvette com PBS durante 5 minutos. Substituir o PBS e repetir a lavagem.
- Secar cuidadosamente as lâminas utilizando o papel absorvente fornecido. O corte do tecido deve permanecer sempre húmido.
- Depositar uma gota do Reagente D em cada poço. Colocar as lâminas numa câmara húmida e incubar à temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos.
- Lavar (ver passo 6) e secar (ver passo 7).
- Depositar várias gotas do Reagente E sobre as lâminas e colocar uma lamela evitando a formação de bolhas de ar.

### LEITURA

Examinar as lâminas com um microscópio de fluorescência (250-400x). É recomendável realizar a leitura imediatamente. Para realizar a leitura, seleccionar campos de observação na zona interior do corte do tecido. A intensidade da fluorescência da periferia do tecido não é representativa da preparação.

Os soros que apresentarem fluorescência na mucosa muscular, nas capas musculares dos vasos sanguíneos e nas fibras interglandulares no estômago de rato às diluições recomendadas deverão ser considerados positivos.

As amostras positivas podem ser tituladas. Define-se o título como a diluição maior que dá resultado positivo.

Quando não forem observadas nenhuma das marcações específicas descritas, o resultado será negativo para os auto-anticorpos indicados.

### CONTROLO DE QUALIDADE

O Controlo Positivo (C+) e o Controlo Negativo (C-) fornecidos com os kits cod 44520 e cod 44524 devem ser ensaiados juntamente com as amostras dos pacientes para verificar a funcionalidade do procedimento do ensaio.

O Controlo Positivo (C+) deve proporcionar a marcação específica descrita no item anterior.

O Controlo Negativo (C-) não deve proporcionar nenhuma marcação específica.

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio programa de Controlo de Qualidade interna, assim como procedimentos de correcção no caso em que os controlos não cumpram com as tolerâncias aceitáveis.

### CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO

O FITC/Evans (R) está calibrado em comparação com o Padrão Internacional da OMS de antiimunoglobulinas humanas de ovelha conjugadas com FITC.

A especificidade do Controlo Positivo ASMA está verificada em comparação com o soro de referência com anticorpos antimúsculo liso (antiactina) W1062 da OMS.

### CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

Os anticorpos antimúsculo liso são os marcadores standard do diagnóstico da Hepatite Auto-imune. Os anticorpos antiactina, um subgrupo de anticorpos antimúsculo liso, são encontrados no soro de um 52-85% dos pacientes com hepatite auto-imune crónica activa e num 22% dos pacientes com cirrose biliar primária. A sua presença em outras doenças auto-imunes como a colangiopatia reflecte a sobreposição deste carácter distintivo destas doenças.

O kit BioSystems anticorpos antimúsculo liso foi usado com 71 soros de uma variedade de pacientes com doenças auto-imunes assim como doadores sadios. Os resultados aparecem seguidamente.

Doenças	n	Positivo	Negativo
<i>Doenças Auto-imunes do Fígado</i>	<b>22</b>	<b>15</b>	<b>8</b>
Colangite	10	4	6
Hepatite Auto-imune	12	11	2
<i>Outras doenças auto-imunes</i>	<b>25</b>	<b>0</b>	<b>25</b>
Anemia Megaloblástica	3	0	3
Doença Celiaca	7	0	7
Tiroidite	9	0	9
Síndrome de Good Pasture	2	0	2
Outras (vasculite, antifosfolípidos)	4	0	4
<i>Controlos Sadios</i>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>24</b>

O diagnóstico clínico não deve basear-se exclusivamente no resultado deste ensaio, senão que deve integrar os dados clínicos e de laboratório.

### NOTAS

- Evitar tocar os cortes de tecidos fixados nos poços durante todo o procedimento.
- Utilizar um frasco de lavagem ou uma pipeta para esta lavagem, evitando a possível contaminação com as amostras adjacentes.

### BIBLIOGRAFIA

- Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
- Whittingham S and Mackay IR. Smooth muscle autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
- Jacob G and Schoenfeld Y. Actin autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.