



AUTOANTIBODIES-RL/RK/RS (AA-RL/RK/RS)



COD 44158 16 determinações	COD 44558 48 determinações	COD 44648 96 determinações
COD 44570 12 x		COD 44639 12 x
CONSERVAR A 2-8°C		
Reagentes para a determinação qualitativa de anticorpos auto-ímmunes Só para uso <i>in vitro</i> no laboratório clínico		

AUTO-ANTICORPOS-RL/RK/RS (AA-RL/RK/RS)

Imunofluorescência Indirecta
FÍGADO/RIM/ESTÔMAGO DE RATO

FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os auto-anticorpos do soro dirigidos contra o núcleo (ANA), as mitocôndrias (AMA), o músculo liso (ASMA), as células parietais gástricas (APCA), a reticulina e outros, unem-se aos seus correspondentes antígenos presentes na preparação que contém fígado, rim e estômago de rato. O complexo antígeno-anticorpo resultante é detectado através da incubação com um anticorpo contra as imunoglobulinas humanas conjugado com fluoresceína e visualizado por microscopia de fluorescência¹.

CONTEÚDO

	COD 44158	COD 44558	COD 44648
A. Lâminas	4 x 4 poços	12 x 4 poços	12 x 8 poços
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. Controlo Positivo ANA-Ho	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
C+. Controlo Positivo AMA	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
C+. Controlo Positivo ASMA	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
C-. Controlo Negativo	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL
D. FITC/Evans (R)	1 x 2,5 mL	1 x 2,5 mL	2 x 2,5 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Papel absorvente	1 x 4	1 x 12	1 x 12

	COD 44570	COD 44639
A. Lâminas	12 x 4 poços	12 x 8 poços

COMPOSIÇÃO

- A. Lâminas:** Secções de fígado, rim e estômago de rato.
- B. PBS (10x):** Fosfato de sódio 112,5 mmol/L, fosfato de potássio 30 mmol/L, cloreto sódico 1,15 mol/L, azida de sódio 0,95 g/L, pH 7,2.
- C+. Controlo Positivo ANA-Ho:** Soro humano com anticorpos antinucleares (ANA) padrão homogéneo, azida de sódio 0,95 g/L.
- C+. Controlo Positivo AMA:** Soro humano com anticorpos antimitocondriais (AMA), azida de sódio 0,95 g/L.
- 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 anti-imunoglobulinas humanas conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e absorvidos com soro de rato, azul de Evans 0,01 g/L, azida de sódio 0,95 g/L.
- E. Mounting Medium.** 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 anti-HCV e anti-HIV. Não obstante, os controlos devem ser tratados com precaução como potencialmente infecciosos.

CONSERVAÇÃO

Conservar a 2-8°C.

Os reagentes são estáveis até a 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: Roturas no pacote contentor, defeitos macroscópicos como raladuras ou descolagens na secção do tecido.

REAGENTES AUXILIARES

- Cod 44158, 44558 e 44648 não precisam de reagentes auxiliares.
- Cod 44570 e 44639 precisam dos seguintes reagentes auxiliares que podem ser adquiridos separadamente:
 - B. PBS (10x).**
 - D. FITC/Evans (R),** conjugado com contração de azul de Evans, ou **FITC (R),** conjugado sem contração de azul de Evans.
 - E. Mounting Medium.** Meio de Montagem.
- Os Controlos Positivos para os diferentes padrões podem ser adquiridos separadamente:
 - C+. Controlo Positivo ANA-Ho:** Anticorpos antinucleares (ANA) padrão homogéneo.
 - C+. Controlo Positivo ANA-Sp:** Anticorpos antinucleares padrão mosqueado.
 - C+. Controlo Positivo ANA-Nu:** Anticorpos antinucleares padrão nucleolar.
 - C+. Controlo Positivo AMA:** Anticorpos antimitocondriais.
 - C+. Controlo Positivo ASMA:** Anticorpos antimúsculo liso.
 - C+. Controlo Positivo APCA :** Anticorpos anticélulas parietais.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

PBS: Efectuar uma diluição 1/10 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 uma semana a 2-8°C.

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

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

PROCEDIMENTO

1. Temperar os reagentes e as amostras à temperatura ambiente.
2. Depositar uma gota (50 µL) da amostra diluída ou dos Controlos nos poços da lâmina, tentando deixar o tecido perfeitamente coberto (Nota 1).
3. Incubar a lâmina na câmara húmida durante 30 minutos à temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminar as gotas das amostras inclinando a lâmina e dar pequenos golpes suavemente. Evitar a mistura de soros.
5. Eliminar o soro restante na lâmina lavando-a com PBS (ver preparação do Reagente). (Nota 2).
6. Lavar a lâmina submergindo-a numa cuvette com PBS durante 5 minutos. Substituir o PBS e repetir a lavagem.
7. Secar cuidadosamente a lâmina utilizando o papel absorvente fornecido. A secção de tecido deve permanecer sempre húmida.
8. Depositar uma gota do Reagente D em cada poço. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar à temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos.
9. Lavar (ver passo 6) e secar (ver passo 7).
10. Depositar várias gotas do Reagente E sobre a lâmina e colocar uma lamela procurando evitar a formação de bolhas de ar.

LEITURA

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

A observação da marcação fluorescente específica descrita em seguida indica um resultado positivo à diluição recomendada.

ANA-homogéneo: Fluorescência uniforme e homogénea em todo o interior do núcleo da célula na interfase. Fluorescência intensa nas células na mitose.

AMA: Fluorescência granular das mitocôndrias no citoplasma das células tubulares renais.

ASMA: Marcação da mucosa muscular, das capas de músculo dos vasos sanguíneos e das fibras interglandulares, no estômago do rato.

APCA: Marcação reticular intracelular das células parietais da mucosa gástrica do rato.

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 é negativo para os auto-anticorpos indicados.

CONTROLO DE QUALIDADE

O Controlo Positivo (C+) e o Controlo Negativo (C-) fornecidos com os cod 44158, cod 44558 e cod 44648 devem ser ensaiados juntamente com as amostras dos pacientes para verificar a funcionalidade do procedimento de 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

Os conjugados FITC/Evans (R) e FITC (R) estão calibrados face ao Padrão Internacional da OMS de anti-imunoglobulinas humanas de ovelha conjugadas com FITC.

A especificidade do Controlo Positivo ANA-Ho está verificada defronte do soro de referência AF/CDC1 dos *Centers for Disease Control /Arthritis Foundation*.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

ANA: A determinação dos anticorpos antinucleares tem uma sensibilidade superior a 95% para o lúpus eritematoso sistémico, e uma baixa especificidade².

AMA: A presença de anticorpos antimitocondriais é associada com a cirrose biliar primária por cima de 95% dos pacientes^{3,4}.

ASMA: Os anticorpos antimúsculo liso encontram-se no soro de um 52-85% dos pacientes com hepatite activa crónica auto-imune e num 22% dos pacientes com cirrose biliar primária^{5,6}.

APCA: Os anticorpos anticélulas parietais encontram-se num 90% dos pacientes com anemia perniciosa, associada normalmente com outras doenças auto-imunes específicas do tecido⁷.

O kit BioSystems Auto-anticorpos-RL/RK/RS foi usado com 188 soros de uma variedade de pacientes com doenças auto-imunes assim como doadores sadios. Os resultados aparecem seguidamente:

Doenças	n	ANA	AMA	ASMA
<i>Doenças hepáticas</i>	46	-	41	17
<i>Cirrose biliar primaria</i>	24	-	22	5
<i>Colangite</i>	10	-	8	4
<i>Hepatite Auto-imune</i>	12	-	11	8
<i>Doenças do tecido conectivo</i>	93	93	-	-
<i>Lúpus eritematoso sistémico</i>	31	31	-	-
<i>Síndrome de Sjögren</i>	11	11	-	-
<i>Esclerodermia</i>	7	7	-	-
<i>Síndrome CREST</i>	3	3	-	-
<i>Artrite reumatóide</i>	11	11	-	-
<i>Dermatopolimiosite</i>	2	2	-	-
<i>Outros</i>	28	28	-	-
<i>Outras doenças auto-imunes</i>	25	0	0	0
<i>Anemia Megaloblástica</i>	3	0	0	0
<i>Doença Celíaca</i>	7	0	0	0
<i>Tiroidite</i>	9	0	0	0
<i>Síndrome de Good Pasture</i>	2	0	0	0
<i>Outros (vasculite, AFL)</i>	4	0	0	0
<i>Controlos sadios</i>	24	0	0	0

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

NOTAS

1. Evitar tocar as secções de tecido dos poços durante todo o procedimento.
2. Utilizar um frasco de lavagem ou uma pipeta para esta lavagem, evitando a possível contaminação com as amostras adjacentes.

BIBLIOGRAFIA

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Leung PSC et al. Mitochondrial Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. MacKay IR, and Gershwin ME. The autoantibodies of primary biliary cirrhosis: clinico pathological correlations. In: Van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996.
5. Whittingham S and Mackay IR. Smooth muscle autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
6. Jacob G and Schoenfeld Y. Actin autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
7. Gleeson PA et al. Parietal Cell Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996