



ANTI-NUCLEAR ANTIBODIES HEp-2 (ANA-HEp-2)

COD 44108 24 determinações	COD 44508 60 determinações	COD 44509 120 determinações
COD 44546 10 x	COD 44547 10 x	
CONSERVAR A 2-8°C		
Reagentes para a determinação qualitativa de anticorpos antinucleares Só para uso <i>in vitro</i> no laboratório clínico		

ANTICORPOS ANTINUCLEARES HEp-2 (ANA- HEp-2)

Imunofluorescência Indirecta
CÉLULAS HEp-2

FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os anticorpos antinucleares (ANA) do soro unem-se aos seus correspondentes antígenos presentes nas células HEp-2. Uma vez unidos, os anticorpos manifestam-se através da incubação com um anticorpo contra as imunoglobulinas humanas conjugado com fluoresceína e são visualizados por microscopia de fluorescência¹.

CONTEÚDO

	COD 44108	COD 44508	COD 44509
A. Lâminas	4 x 6 poços	10 x 6 poços	10 x 12 poços
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. Contr. Posit. ANA- HEp-2	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
C-. Controlo Negativo	1 x 0,3 mL	1 x 0,3 mL	2 x 0,3 mL
D. IgG FITC/Evans	1 x 3 mL	1 x 3 mL	2 x 3 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Papel Absorvente	1 x 4	1 x 10	1 x 10

	COD 44546	COD 44547
A. Lâminas	10 x 6 poços	10 x 12 poços

COMPOSIÇÃO

- A. Lâminas:** Células HEp2 cultivadas em cada poço.
- 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-HEp-2:** Soro humano com anticorpos antinucleares (ANA) padrão homogéneo, azida de sódio 0,95 g/L.
- C-. Controlo Negativo:** Soro humano, azida de sódio 0,95 g/L.
- D. IgG FITC/Evans:** Anticorpos de cabra anti-imunoglobulinas IgG humanas conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), 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 o 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 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: Roturas no pacote contendor, defeitos macroscópicos como raladuras ou descolagens no cultivo das células.

REAGENTES AUXILIARES

- Cod 44108, 44508 e 44509 não precisam de reagentes auxiliares.
- Cod 44546 e 44547 precisam dos seguintes reagentes auxiliares que podem ser adquiridos separadamente:
 - B. PBS (10x)**
 - D. IgG FITC/Evans**, conjugado com contração de azul de Evans, ou **IgG FITC**, conjugado sem contração de azul de Evans.
 - E. Mounting Medium.** Meio de Montagem.
- Os Controlos Positivos ANA para diferentes padrões estão disponíveis separadamente:
 - C+. Controlo Positivo ANA-Sp:** Anticorpos antinucleares (ANA) padrão mosqueado.
 - C+. Controlo Positivo ANA-Nu:** Anticorpos antinucleares (ANA) padrão nucleolar.
 - C+. Controlo Positivo ANA-Ce:** Anticorpos antinucleares (ANA) padrão centrómero.

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 1/80 em PBS (ver Preparação dos Reagentes) antes do ensaio.

Para a titulação de uma amostra positiva, realizar diluições duplas em PBS a partir da 1/160.

No entanto, cada laboratório deverá estabelecer o seu próprio exemplo de diluição baseado nas características da população.

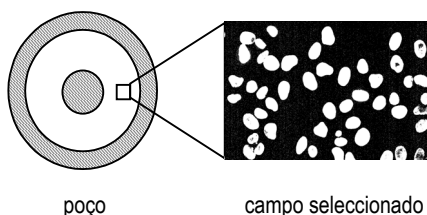
PROCEDIMENTO

- Temperar os reagentes e as amostras à temperatura ambiente.
- Depositar uma gota (50 µL) da amostra diluída ou dos Controlos nos poços da lâmina (A), tentar cobrir perfeitamente (Nota 1).
- Incubar a lâmina na câmara húmida durante 30 minutos à temperatura ambiente (15-30°C).
- Eliminar as gotas das amostras inclinando a lâmina e dar golpes suavemente. Evitar a mistura de soros.
- 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. El substrato deve permanecer sempre húmido.
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 evitando 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 os campos de observação da zona indicada no esquema, entre o centro e a periferia do poço. Seleccionar os campos com distribuição de células e intensidade de fluorescência uniformes. A intensidade da marcação da periferia ou do centro do poço não é representativa da preparação.



poço

campo seleccionado

A observação da marcação fluorescente específica descrita seguidamente, indica um resultado positivo na diluição recomendada.

– **ANA:** Existem diferentes padrões de fluorescência nuclear que podem coexistir num mesmo soro e inclusive serem modificados com a diluição do mesmo. Os principais padrões antinucleares são:

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

Periférico: Marcação na periferia do núcleo, de maior intensidade no perímetro interior, e marcação homogénea no resto do núcleo.

Mosqueado: Marcação fluorescente em forma de granulado grosso. Os nucléolos não estão marcados. Os grânulos podem ter tamanhos e formas diversas dependendo do antígeno que reagir.

Nucleolar: Existem dois padrões nucleolares: a) Marcação nucleolar de padrão homogéneo. Com frequência acompanhado de uma débil marcação homogénea no resto do núcleo. b) Marcação mosqueada dos nucléolos nas células na interfase. Marcação exacta das regiões organizadoras dos cromossomas mitóticos.

Centrómero: Ponteados discretos nas células na interfase (46 pontos ou múltiplos). Os pontos alinham-se com os cromossomas nas células na metáfase.

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

Quando não se observar 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 kits cod 44108, cod 44508 e cod 44509 devem ser ensaiados junto com as amostras dos pacientes para verificar a funcionalidade do procedimento de ensaio.

O Controlo Positivo deve proporcionar a marcação específica descrita no item anterior.

O Controlo Negativo não deve proporcionar nenhuma marcação específica.

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

CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO

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

A especificidade do Controlo Positivo ANA-HEp-2 está verificada defronte ao soro de referência AF/CDC1 dos *Centers for Disease Control*.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

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

Homogéneo: Indicativo de lúpus eritematoso sistémico.

Periférico: Nos pacientes com doenças do tecido conectivo.

Mosqueado: Associado ao lúpus eritematoso sistémico, doença mista do tecido conectivo, síndrome de Sjögren, polimiosite ou esclerodermia.

Nucleolar: Em aproximadamente um 50-70% dos pacientes com solapamento de esclerodermia e polimiosite/dermatomiosite. Apresenta-se em até um 33% dos pacientes com esclerodermia sistémica, especialmente com complicações renais².

Centrómero: Nos pacientes com esclerose sistémica, especialmente na forma da doença com implicação cutânea (80%). Ocasionalmente, em outras doenças conectivas³.

O kit BioSystems de anticorpos anti-nucleares foi usado para determinar 140 soros de uma variedade de pacientes com doenças auto-imunes (lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, esclerodermia, síndrome de CREST, dermatopolimiosite, artrite reumatóide, hepatite auto-imune e cirrose biliar primária), assim como doadores sãos. Os resultados mostraram uma sensibilidade e especificidade de diagnóstico para o conjunto de doenças auto-imunes de 98,3% e 93%, respectivamente.

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

NOTAS

1. Evitar tocar as células do poço 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. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. En: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Fritzler MJ, Rattner JB. Autoantibodies to the mitotic apparatus: biological breakthroughs, clinical application, etiological complexity. En: Konrad K, Humbel RL, Meurer M, Shonfeld Y and Tan EM, eds. Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity. Pabst Science Publishers, 2000.