

Código do Produto: 704145, 704150, 704155, 704255
504145, 504145.10, 504150, 504150.25,
504155.25, 504255.25

Complexidade CLIA: Elevada

Aplicação Diagnóstica

As secções de esófago de macaco são utilizadas como substrato para a pesquisa de anticorpos anti intra-epiderme ou zonas membranosas basais no soro humano, como um auxílio no diagnóstico de pênfigo e penfigóide bolhosa respectivamente. Estas secções poderam ainda ser utilizadas para detecção de anticorpos anti-endomísio como auxílio no diagnóstico da doença celíaca.

Resumo e Explicação do teste

Anticorpos intra-epidermais da classe IgG são caracterizados pelas várias formas clínicas de reacções ao pênfigo cujos antigénios se encontram presentes na superfície das células de queratinócitos epidermais. Um resultado positivo dá um padrão característico de “tela metálica”. Uma deposição de imunoglobulinas no tecido ocorre em praticamente todos os casos. É recomendado que se investigue quer o soro, quer o tecido dos pacientes para o diagnóstico da doença bolhosa.

Anticorpos anti-membrana basal são classicamente encontrados em penfigóide bolhosa. Nesta doença, uma biópsia directa revela uma deposição linear de IgG e C3 ao longo da junção dermo-epidermal. Estes autoanticorpos são regularmente, mas não sempre, encontrados no soro de doentes afectados. Contudo, a titulação destes anticorpos não correlaciona com o estado de doença, e com remissão de anticorpos pode-se encontrar presente quer no tecido, quer no soro.

No kit encontrará um conjugado anti-IgG humana (H&L) marcado com FITC para revelar ambos os autoanticorpos.

Anticorpos anti-endomísio são específicos contra as fibras de reticulina no tecido conjuntivo à volta das fibras de músculo liso no tracto intestinal de primatas. Com cerca de 100% de sensibilidade e especificidade são relatados para anticorpos anti-endomísio activos da classe IgA na doença celíaca.^{1,2} Estes anticorpos são detectados pelo conjugado anti-IgA humana marcado com FITC fornecido no kit.

Princípio do Procedimento

É utilizada uma técnica por imunofluorescência indirecta, com este kit,³ onde quer as amostras dos doentes, quer os controlos apropriados são incubados com secções. Os anticorpos que não reagem são eliminados por lavagem, sendo depois aplicado um conjugado marcado com fluoresceína. O conjugado excedente é depois removido também por lavagem. As lâminas são observadas ao microscópio de fluorescência, onde se observa uma fluorescência “verde-maçã” no caso das amostras positivas, que correspondem a áreas de secções onde o anticorpo se ligou.

Reagentes

1. Secções de esófago de macaco em lâminas de 5 e 10 poços, com excicante

704145 e 704150 Somente os kits:

2. Dois soros controlo positivo (derivados de soro humano), um dando um padrão “tela metálica” pênfigo e outro dando um padrão endomísio “reticulina” em secções de esófago de macaco, contendo azida de sódio a 0,09% como conservante. **Pré-diluído, pronto a usar.**
3. Soro controlo negativo, universalmente negativo para todos os autoanticorpos, contendo azida azida de sódio a 0,09% como conservante. **Pré-diluído, pronto a usar.**
4. Tampão fosfato (PBS), 40x concentrado na forma líquida.
5. Conjugado anti-IgG (H&L) humano purificado em ovelha, (adsorvido de macaco) marcado com fluoresceína eu conjugado anti-IgA humana marcado com fluoresceína, contendo azida azida de sódio a 0,09% como conservante. **Pré-diluído, pronto a usar.**
6. Azul de Evans 1%, como contrastante opcional
7. Discos absorventes
8. Meio de montagem, contendo um agente que evita a perda de fluorescência
9. Lamelas

704155 Somente os kit:

2. Soros controlo positivo (derivados de soro humano), Dando um padrão endomísio “reticulina” em secções de esófago de macaco, contendo azida de sódio a 0,09% como conservante. **Pré-diluído, pronto a usar.**
3. Soro controlo negativo, universalmente negativo para todos os autoanticorpos, contendo azida azida de sódio a 0,09% como conservante. **Pré-diluído, pronto a usar.**
4. Tampão fosfato (PBS), 40x concentrado na forma líquida.
5. Conjugado anti-IgA humana marcado com fluoresceína, contendo azida azida de sódio a 0,09% como conservante. **Pré-diluído, pronto a usar.**

6. Azul de Evans 1%, como contrastante opcional
7. Discos absorventes
8. Meio de montagem, contendo um agente que evita a perda de fluorescência
9. Lamelas

704255 Somente os kit:

Note que estas lâminas têm um formato diferente daquele descrito no folheto principal, sendo compatíveis com pipetas multicanal. Isto apenas afecta a posição dos poços. Todas as outras características técnicas e de desempenho das lâminas permanecem iguais.

1. Secções de esófago de macaco em multicana lâminas de 10 poços, com excicante
2. Soros controlo positivo (derivados de soro humano), Dando um padrão endomísio “reticulina” em secções de esófago de macaco, contendo azida de sódio a 0,09% como conservante. **Pré-diluído, pronto a usar.**
3. Soro controlo negativo, universalmente negativo para todos os autoanticorpos, contendo azida de sódio a 0,09% como conservante. **Pré-diluído, pronto a usar.**
4. Tampão fosfato (PBS), 40x concentrado na forma líquida.
5. Conjugado anti-IgA humana marcado com fluoresceína, contendo azida de sódio a 0,09% como conservante. **Pré-diluído, pronto a usar.**
6. Azul de Evans 1%, como contrastante opcional
7. Meio de montagem, contendo um agente que evita a perda de fluorescência
8. Lamelas

Advertências/ Precauções

Todos os dadores de soro fornecido nos kits foram examinados e determinados negativos para o antigénio da superfície do vírus Hepatite B, anticorpos contra o vírus da Hepatite C e para o Vírus de Imunodeficiência Humana (HIV 1 & 2). No entanto estes testes não garantem a ausência de agentes infecciosos. Deverão ser estabelecidas medidas adequadas para o manuseamento e eliminação de material potencialmente infectado e o procedimento deverá ser efectuado apenas por pessoal treinado nestes métodos. O Azul de Evans e os controlos do kit contêm azida de sódio a 0,09% como conservante e devem ser manuseados com cuidado – não ingerir nem permitir o contacto com a pele ou membranas mucosas. Em caso de contacto lavar abundantemente com água e procurar um médico. Podem formar-se azidas metálicas explosivas nas canalizações de cobre e alumínio; quando eliminar o reagente lavar abundantemente com água para impedir a formação das azidas. Este produto deve ser utilizado apenas por pessoal treinado e para o objectivo indicado. Recomenda-se que seja seguido o procedimento.

Condições de Armazenamento

Os kits fechados devem ser armazenados a 2-8°C e podem ser utilizados até à data de validade inscrita. NÃO CONGELAR. Quando se retirar as lâminas do invólucro, estas deverão ser utilizadas imediatamente. O PBS diluído pode ser armazenado até um mês a 2-8°C. Todos os reagentes devem ser armazenados a 2-8°C.

Colheita de Amostras

As amostras de sangue devem ser colhidas por punção venosa, deixar coagular naturalmente e separar o soro o mais rápido possível para prevenir a hemólise. O soro pode ser conservado de 2-8°C até 7 dias antes do teste, ou em aliquotas a -20°C ou menos, para períodos mais prolongados.⁸ NÃO congelar e descongelar o soro mais do que uma vez. Evitar a utilização de soros lipémicos, hemolisados e contaminados com microorganismos dado que poderá ocorrer uma diminuição dos títulos ou um padrão de marcação pouco claro.

Procedimento

Material fornecido (kits)

704145

1. 10 x *Monkey Oesophagus – 5-well slide* (Lâminas com substrato de esófago de macaco, 5 poços)
2. 1 x 1mL *Pemphigus Positive Control* (Controlo positivo pênfigo, pré-diluído)
3. 1 x 1mL *Endomysial (Celiac) Positive Control* (Controlo positivo endomísio (celiac), pré-diluído)
4. 1 x 1mL *IFA System Negative Control* (Controlo negativo IFA, pré-diluído)
5. 1 x 7mL *FITC IgG (H&L), monkey adsorbed Conjugate* (anti-IgG (H&L) marcado com FITC, adsorvido de macaco)
6. 1 x 7mL *Anti-Human IgA (α) AFF FITC* (anti-IgA (cadeia α) humana marcado com FITC)
7. 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (1% Contrastante Azul de Evans)
8. 2 x 25mL *PBS concentrate (x40)* (PBS concentrado, x40)
9. 1 x 3mL *Mounting Medium* (Meio de montagem)
10. 20 x *Blotters* (Discos absorventes)
11. 10 x *Coverslips* (Lamelas)
12. 1 x folheto de instruções

704150

1. 25 x *Monkey Oesophagus – 10-well slide* (Lâminas com substrato de esófago de macaco, 10 poços)
2. 1 x 1mL *Pemphigus Positive Control* (Controlo positivo pêfnigo, pré-diluído)
3. 1 x 1mL *Endomysial (Celiac) Positive Control* (Controlo positivo endomísio (celiac), pré-diluído)
4. 1 x 1mL *IFA System Negative Control* (Controlo negativo IFA, pré-diluído)
5. 1 x 15mL *FITC IgG (H&L), monkey adsorbed Conjugate* (anti-IgG (H&L) marcado com FITC, adsorvido de macaco)
6. 1 x 15mL *Anti-Human IgA (α) AFF FITC* (anti-IgA (cadeia α) humana marcado com FITC)
7. 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (1% Contrastante Azul de Evans)
8. 2 x 25mL *PBS concentrate (x40)* (PBS concentrado, x40)
9. 1 x 10mL *Mounting Medium* (Meio de montagem)
10. 50 x *Blotters* (Discos absorventes)
11. 25 x *Coverslips* (Lamelas)
12. 1 x folheto de instruções

704155

1. 25 x *Monkey Oesophagus – 10-well slide* (Lâminas com substrato de esófago de macaco, 10 poços)
2. 1 x 1mL *Endomysial (Celiac) Positive Control* (Controlo positivo endomísio (celiac), pré-diluído)
3. 1 x 1mL *IFA System Negative Control* (Controlo negativo IFA, pré-diluído)
4. 2 x 15mL *Anti-Human IgA (α) AFF FITC* (anti-IgA (cadeia α) humana marcado com FITC)
5. 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (1% Contrastante Azul de Evans)
6. 2 x 25mL *PBS concentrate (x40)* (PBS concentrado, x40)
7. 1 x 10mL *Mounting Medium* (Meio de montagem)
8. 50 x *Blotters* (Discos absorventes)
9. 25 x *Coverslips* (Lamelas, 22 x 70mm)
10. 1 x folheto de instruções

704255

1. 25 x *Monkey Oesophagus – 10-well Multichannel slide* (Multicanal lâminas com substrato de esófago de macaco, 10 poços)
2. 1 x 1mL *Endomysial (Celiac) Positive Control* (Controlo positivo endomísio (celiac), pré-diluído)
3. 1 x 1mL *IFA System Negative Control* (Controlo negativo IFA, pré-diluído)
4. 2 x 15mL *Anti-Human IgA Fluorescein Conjugate* (anti-IgA (cadeia α) humana marcado com FITC)
5. 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (1% Contrastante Azul de Evans)
6. 2 x 25mL *PBS concentrate (x40)* (PBS concentrado, x40)
7. 1 x 10mL *Mounting Medium* (Meio de montagem)
8. 25 x *Coverslips* (Lamelas)
9. 1 x folheto de instruções

Material fornecido (lâminas)

504145	1 x Esófago de macaco, 5- poços
504145.10	10 x Esófago de macaco, 5- poços
504150	1 x Esófago de macaco, 10- poços
504150.25	25 x Esófago de macaco, 10- poços
504155.25	25 x Esófago de macaco, 10- poços
504255.25	25 x Esófago de macaco, 10- poços

Material adicional necessário

Água destilada para diluir o PBS concentrado

Recipiente para o tampão PBS

Micropipetas e pontas descartáveis para aplicação das amostras dos doentes

Câmara húmida para os passos de incubação

Microscópio de fluorescência com filtro excitador de 495nm e um filtro barreira de 515nm.

Esguicho de plástico para a lavagem com PBS.

No caso de utilização apenas das lâminas, pode adquirir-se o seguinte material à INOVA Diagnostics: PBS (508002), controlo negativo IFA (508186), controlo positivo pêfnigo (504051), controlo positivo penfigóide (504055), controlo positivo endomísio (504050), conjugado FITC (H+L), humana adsorvido de macaco (504011, 504071), conjugado anti-IgA (cadeia α) humana (504023, 504045), conjugado anti-IgA (cadeia α) humana adsorvido de macaco (504015), Azul de Evans a 1% (504049) e meio de montagem (508001, 508005, 508006).

Procedimento

Controlo de qualidade

Os controlos positivos e negativos devem ser utilizados sempre que são testadas as amostras.

1. **Diluir o PBS concentrado.** Diluir o PBS concentrado em água destilada (1 parte de PBS concentrado + 39 partes de água destilada) e misturar bem. Nota: Diluir todo o PBS apenas se todo o kit for utilizado dentro de um mês. O PBS é utilizado para diluir as amostras dos doentes e como tampão de lavagem.
2. **Diluição das amostras.** Diluir as amostras 1/10 através da adição de 20 μ L de soro e 180 μ L de tampão PBS.
3. **Lâminas com substrato.** Deixar as lâminas com substrato atingirem a temperatura ambiente (18-28°C) antes de se retirarem do invólucro. Rotular as amostras correctamente, colocar na câmara húmida e adicionar uma gota do controlo positivo e do controlo negativo nos poços apropriados. Adicionar 50 μ L de amostra previamente diluída nos restantes poços.

4. **Incubação das lâminas.** Incubar as lâminas durante 30 minutos na câmara húmida à temperatura ambiente (18-28°C). (Toalhetes de papel húmidos colocados no fundo da câmara ajudam a manter a humidade.)
5. **Lavagem com PBS.** Remover as lâminas da câmara húmida e lavar abundantemente com o esguicho de PBS, mas com cuidado. Não deitar directamente nos poços. Colocar as lâminas num suporte e imergi-las em PBS e agitar durante 5 a 10 minutos.
6. **Adição do conjugado fluorescente.** Sacudir o excesso de PBS e absorvê-lo em volta dos poços utilizando os discos absorventes ou outro tipo de papel. Colocar novamente as lâminas na câmara húmida e imediatamente adicionar uma gota de conjugado fluorescente em cada poço. O Aff FITC conjugado anti-IgG (H&L) humano marcado com FITC é para ser utilizado na detecção de autoanticorpos da pele e o conjugado anti-IgA humano marcado com FITC é para ser utilizado na detecção de autoanticorpos anti-endomísio. **NÃO DEIXAR OS POÇOS SECOS POR MAIS DE 15 SEGUNDOS.**
7. **Incubação da lâmina.** Incubar as lâminas durante 30 minutos na câmara húmida à temperatura ambiente (18-28°C) e no escuro.
8. **Lavagem com PBS.** Lavar novamente como descrito no passo 5.
9. **Contraste opcional.** Adicionar 2-3 gotas de Azul de Evans a 1% por 100mL de PBS antes da imergir a lâmina.
10. **Montagem com a lamela.** Remover uma lâmina de cada vez da solução de PBS. Secar rapidamente em volta dos poços e adicionar uma gota de meio de montagem a cada poço. Colocar cuidadosamente a lamela na lâmina, evitando a formação de bolhas de ar; no entanto se existirem não tentar removê-las.
11. **Visualização das lâminas num microscópio de fluorescência.** As lâminas podem ser armazenadas a 2-8°C na escuridão durante três dias sem perda significativa da fluorescência.

Resultados

Controlo de qualidade

Os controlos positivos deverão dar um padrão verde-maçã brilhante nos rebordos intercelulares do epitélio (padrão de “tela metálica”) para pênfigo e fibras de reticulina no tecido conjuntivo à volta do músculo liso para o controlo endomísio. O controlo negativo deverá revelar uma coloração verde ténue em todo o tecido, não evidenciando uma fluorescência marcada. Se os controlos não se revelarem como o descrito, o teste deve ser considerado inválido e deverá ser repetido.

Interpretação dos resultados

Ver referência 5 para observar exemplos de imagens fotográficas destes padrões. Os resultados são considerados positivos ou negativos.

Anticorpo positivo de pênfigo

Coloração do rebordo intercelular do epitélio estratificado.

Anticorpo positivo de penfigóide

Coloração da zona da membrana basal ao longo da junção dermo epidermal.

Anticorpo positivo endomísio⁴

Coloração das fibras de reticulina do tecido conjuntivo à volta das fibras de músculo liso.

Nota: Cada laboratório deve estabelecer qual o ponto em que um resultado positivo é considerado como tendo significado clínico.

Limitações do Procedimento

1. A fonte de luz, os filtros e as oculares de microscópios de fluorescência diferentes irão influenciar a sensibilidade do teste. A qualidade do microscópio é significativamente influenciado pela manutenção correcta, especialmente o cimbre da lâmpada de vapor de mercúrio e substituição da lâmpada após o período de tempo recomendado.
2. O tecido de esófago de macaco é inerentemente predisposto à autofluorescência, independentemente do processo de manufactura utilizado para produzir lâminas de tecido. Este facto tende a ser muito pronunciado na lâmina própria e regiões da submucosa. Deve-se ter algum cuidado na interpretação das amostras cujo resultado é um padrão de coloração fraco da muscularis da mucosa, isto é, coloração do músculo liso e endomísio.
3. Anti-nuclear (ANA), anti-mitocondrial (AMA), anti-músculo liso (ASMA) e anticorpos anti-músculo esquelético podem reagir com o substrato de esófago. A presença destes autoanticorpos deve ser confirmada com os substratos apropriados.
4. Podem ocorrer reacções cruzadas devido à presença de anticorpos grupo sanguíneo anti-A e anti-B, isto porque a mucosa do esófago pode conter certas substâncias dos grupos sanguíneos.⁶ Em alguns doentes o padrão de coloração pode ser similar à presença de anticorpos pênfigos, embora os anticorpos do grupo sanguíneo também podem marcar capilares na musculatura do esófago.
5. Devido à curta distância existente entre os poços nas lâminas com 10, é possível que possa existir contaminação de amostras e controlos. É assim necessário um maior cuidado, especialmente nas etapas de lavagem, de modo a assegurar que este facto não ocorra.
6. Este teste só por si não deve ser considerado como diagnóstico. Todos os outros factores, incluindo o historial clínico do doente e outros resultados serológicos ou biópsias devem também ser levados em consideração.
7. Os reagentes da o outro fabricados não foram avaliados quanto à sua conveniência para serem utilizados com reagentes para IFA de outras marcas. A sua utilização não deve contudo ser necessariamente excluída.

Note que estas lâminas têm um formato diferente daquele descrito no folheto principal, sendo compatíveis com pipetas multicanal. Isto apenas afecta a posição dos poços. Todas as outras características técnicas e de desempenho das lâminas permanecem iguais.

As lâminas vendidas em separado têm a classificação de “Reagentes específicos de analitos”.

Excepto como componente do kit, as características analíticas e de desempenho não foram estabelecidas.

Valores Esperados

As lâminas de esfago de macaco foram utilizadas para testar doentes com pênfigo e penfigóide, bem como 20 dadores de sangue indiferenciados. Os resultados foram:

Grupo de doentes	Número	Número de positivos	
		Intercelular	Zona membranar basal
Pênfigo	12	12	0
Penfigóide	11	0	9
Normais	20	0	0

Anticorpos endomísio da classe IgA

Subjeitos/diagnostico	Positivo/total	% Positivos
Doença celíaca confirmada		
Com gluten	38/38	100
Com dieta sem gluten	17/37	46
Suspeita de doença celíaca		
Com glúten	27/30	90
Com dieta sem glúten	5/30	17
Dermatite herpetiforme (total)	203/253	80
(sub-total) atrofia do villous confirmada	42/42	100
Dadores de sangue normais	0/87	0
Controlos doença (Gastro intestinal)		
Colite ulcerativa	0/59	0
Doença de Crohns	0/41	0
Doença do fígado	0/20	0
Diarréia infecciosa	0/210	0
Diarréia em crianças pequenas	0/170	0
Diarréia recorrente	0/124	0
Sensibilidade às proteínas do leite	0/60	0
Controlos doença (pele)		
Dermatite bolhosa linear IgA	0/41	0
Doenças não dermatite herpetiforme	0/180	0

Dados compilados de diferentes estudos, Chorzelski *et al* 1990⁷

Características específicas

Um estudo comparativo foi efectuado em 43 amostras de soro (35 clínicas, 8 normais) utilizando este kit e dois kits comerciais de referência disponíveis, um para amostras positivas de pênfigo e penfigóide, e o outro para amostras positivas de endomísio. Globalmente, houve uma boa correlação entre todos estes kits. Para pênfigo, 10 das 13 amostras foram testadas positivas com ambos os kits. Duas das amostras discrepantes deram um resultado positivo no limite, no caso do kit, mas negativos no kit de referência. Para penfigóide, todas as 4 amostras positivas testadas deram resultados coincidentes, embora a coloração tenha sido um pouco mais fraca no kit competidor. Para as amostras endomísio positivas, todas elas revelaram resultados positivos para ambos os métodos utilizados. As 8 amostras normais testadas deram resultados negativos em todos os três kits.

Sumário do procedimento

1. Diluir o PBS com água destilada.
2. Diluir as amostras 1/10 com PBS.
3. Equilibrar as lâminas com o substrato à temperatura ambiente (18-28°C).
4. Aplicar 50µL dos controlos positivo e negativo e soros diluídos nos poços apropriados.
5. Incubar em câmara húmida durante 30 minutos.
6. Lavar com PBS durante 5 a 10 minutos.
7. Secar à volta de cada poço e colocar imediatamente com uma gota de conjugado.
8. Incubar como indicado na passo 5.
9. Lavar como na passo 6.
10. Colocar meio de montagem.
11. Observar a lâmina num microscópio de fluorescência.

NOVA Lite e INOVA Diagnostics são marcas registradas
Copyright 2011. Todos os Direitos Reservados©

Referências

1. Sacchetti L, Ferrajolo A et al. (1996): Diagnostic value of various serum antibodies detected by diverse methods in childhood coeliac disease. *Clinical Chemistry* **42**: 11; 1838 – 1842.
2. Sategna-Guidetti C et al. (1995): Comparison of serum anti-gliadin, anti-endomysium and anti-jejunum antibodies, in adult celiac sprue. *J. Clin. Gastroenterol.* **20** (1) 17 – 21.
3. Weller, T H, Coons, A H. (1954): Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in vitro: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **86**: 789-794.
4. Hallstrom, O. (1989): Comparison of IgA class reticulin and endomysium antibodies in coeliac disease dermatitis herpetiformis *Gut.* **30**: 1225-1232.
5. Bradwell A R et al. (1999): *Advanced atlas of autoantibody patterns on tissues.* Pub: The Binding Site Ltd., Birmingham UK.
6. Szulman A E. (1962): The histological distribution of blood group substances A and B in man. *J. Exp. Med.* **115**: 977
7. Chorzelski, T P et al. (1990): *Serologic Diagnosis of Celiac Disease.* CRC Press Boca Raton.
8. *Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004.* Ed. A Milford Ward, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

Fabricado por:

INOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America

Technical Service (U.S. & Canada Only) : 877-829-4745
Technical Service (Outside the U.S.) : 00+ 1 858-805-7950
support@inovadx.com

Representante Autorizado:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

624145PRT

April 2011
Revision 1

