

Para Diagnóstico *In Vitro*

Código do Produto: 704170, 704180
504170.10, 504180.25

Complexidade CLIA: Elevada

Aplicação Diagnóstica

Este produto destina-se à pesquisa e quantificação de autoanticorpos existentes no soro humano, como complemento ao diagnóstico e tratamento de várias doenças autoimunes. Os quatro principais grupos de autoanticorpos detectados são: anticorpos anti-nucleares (ANA), anticorpos anti-mitochondriais (AMA), anticorpos anti-músculo liso (ASMA) e anticorpos anti-células gástricas parietais (AGPCA).

Resumo e Explicação do teste

A imunofluorescência indirecta é o método de referência para o despiste e quantificação de autoanticorpos no soro. As secções de tecido animal, e.g. de ratazana, são geralmente preferidos em relação aos substratos usuais incluindo secções de tecido humano e preparações celulares devido à falta de interferência entre HLA e/ou outros anticorpos do sangue. A utilização de três tecidos diferentes (fígado, rim e estômago) torna mais fácil a identificação dos autoanticorpos comparando os resultados obtidos em cada tecido.

Os autoanticorpos estão associados a um grande número de doenças. Os ANA encontram-se presentes no soro de doentes com Lúpus eritimatoso sistémico (SLE) mas são também comuns nos casos de doenças reumatóide e do tecido conjuntivo. Os AMA estão frequentemente relacionados a casos de cirroses biliares primárias e outras doenças hepáticas. Os ASMA estão associados a hepatites crónicas e cirroses biliares primárias, no entanto encontram-se em baixas concentrações noutras situações. Os AGPCA aparecem maioritariamente em doentes com anemia perniciosa. Na os resultados secção será dada uma descrição mais detalhada de quais os autoanticorpos associados a cada doença.¹⁻⁹

Princípio do Procedimento

A imunofluorescência indirecta é utilizada quando as amostras dos doentes e os controlos apropriados são incubados com o substrato das lâminas.¹⁰ Os anticorpos que não reagem são eliminados por lavagem e é aplicado um conjugado marcado com fluoresceína. O conjugado que não se liga ao substrato é também eliminado por lavagem, e procede-se à visualização da lâmina num microscópio de fluorescência. As amostras positivas apresentarão uma fluorescência “verde-maçã” que corresponde a áreas da secção congelada onde o anticorpo se ligou.

Reagentes

1. Secções de fígado, rim e estômago de ratazana em lâminas de 5 ou 10 poços, com excicante

Somente os kits:

2. Soro controlo positivo homogéneo para ANA Padrão, contendo 0,09% de azida de sódio. **Pré-diluído, pronto a usar.**
3. Soro controlo negativo IFA Sistema contendo 0,09% de azida de sódio. **Pré-diluído, pronto a usar.**
4. IgG (H+L) de cabra anti-humana, purificada e conjugada com isocianato de fluoresceína (FITC) contendo 0,09% de azida de sódio. **Pré-diluído, pronto a usar.**
5. Soro controlo positivo Mitochondrial (AMA) Padrão, contendo 0,09% de azida de sódio. **Pré-diluído, pronto a usar.**
6. Soro controlo positivo Músculo Liso (ASMA) Padrão contendo 0,09% de azida de sódio. **Pré-diluído, pronto a usar.**
7. 1% de Evans Blue, contrastante opcional
8. Tampão fosfato (PBS), concentrado 40x na forma líquida.
9. Papel absorvente “Blotters”, para absorver o excesso da lâmina após a lavagem
10. Meio de montagem, com agente que evita a perda de fluorescência (DABCO) 1,4 octanato dazabíciclo [2.2.2]
11. Lamelas

Advertências/Precauções

Todos os dadores de soro fornecido nos kits foram analisados e considerados negativos para o antigénio da Hepatite B, anticorpos contra o vírus da Hepatite C e para o Vírus de Imunodeficiência Humano (HIV 1 & 2). No entanto estes testes não garantem a ausência de agentes infecciosos. Deverão ser tomadas medidas adequadas quando se procede ao manuseamento e eliminação de todo o material potencialmente infectado; os métodos deverão ser executados por pessoal especializado e treinado.

O Azul de Evans e os controlos contêm 0,09% de azida de sódio como conservante e devem ser manuseados com cuidado – não ingerir nem permitir o contacto com a pele ou membranas mucosas. No 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 de modo a impedir a formação das azidas. Este produto deve ser utilizado por pessoal treinado e deve ser utilizado apenas para os fins a que se propõe. Recomenda-se seja seguido o procedimento descrito.

Condições de Armazenamento

Os kits e as lâminas fechados devem ser armazenados a 2-8°C e podem ser utilizados até à data de validade inscrita na embalagem. NÃO CONGELAR. Desde que as lâminas sejam retiradas do invólucro de alumínio em que se encontram, devem ser utilizadas imediatamente. O PBS diluído pode ser armazenado durante 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 venepunctura, deixar coagular naturalmente e separar o soro o mais rapidamente possível para evitar a hemólise. O soro pode ser conservado de 2-8°C até 7 dias antes do teste¹¹, ou em aliquotas a -20°C ou menos, para períodos mais prolongados. NÃO congelar e descongelar o soro mais do que uma vez. Evitar a utilização de soro contaminado com lípidos, hemolisados ou micróbios dado que pode ocorrer uma coloração fraca e diminuição dos títulos.

Procedimento

Material fornecido (kits)

704170

1. 10 x *Rat liver, kidney, stomach slide (5-well)* (Lâminas com fígado, rim e estômago de ratazana, 5-poços)
2. 1 x 1mL *ANA Homogeneous Pattern* (ANA Homogéneo Padrão, pré-diluído)
3. 1 x 1mL *IFA System Negative Control* (Controlo negativo IFA Sistema, pré-diluído)
4. 1 x 1mL *Mitochondrial (AMA) Pattern* (Mitocondrial (AMA) Padrão, pré-diluído)
5. 1 x 1mL *Smooth Muscle (ASMA) Pattern* (Músculo liso (ASMA) Padrão, pré-diluído)
6. 1 x 7mL *FITC IgG (H&L) Conjugate* (IgG (H+L) conjugada com FITC)
7. 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (1% Contrastante Evans Blue)
8. 2 x 25mL *PBS Buffer* (Tampão PBS, x40 conc)
9. 1 x 3mL *Mounting Medium* (Meio de montagem)
10. 20 x *Blotters* (Discos absorventes)
11. 10 x *Coverslips* (Lamelas)
12. 1 x *Instruction Leaflet* (1 x folheto de instruções)

704170

1. 25 x *Rat liver, kidney, stomach slide (10-well)* (Lâminas com fígado, rim e estômago de ratazana, 10-poços)
2. 1 x 1mL *ANA Homogeneous Pattern* (ANA Homogéneo Padrão, pré-diluído)
3. 1 x 1mL *IFA System Negative Control* (Controlo negativo IFA Sistema, pré-diluído)
4. 1 x 1mL *Mitochondrial (AMA) Pattern* (Mitocondrial (AMA) Padrão, pré-diluído)
5. 1 x 1mL *Smooth Muscle (ASMA) Pattern* (Músculo liso (ASMA) Padrão, pré-diluído)
6. 1 x 15mL *FITC IgG (H&L) Conjugate* (IgG (H+L) conjugada com FITC)
7. 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (1% Contrastante Evans Blue)
8. 2 x 25mL *PBS Buffer* (Tampão PBS, x40 conc)
9. 1 x 10mL *Mounting Medium* (Meio de montagem)
10. 50 x *Blotters* (Discos absorventes)
11. 25 x *Coverslips* (Lamelas)
12. 1 x *Instruction Leaflet* (1 x folheto de instruções)

Material fornecido (lâminas)

1. **504170.10** – 10 x *Rat liver, kidney, stomach slide (5-well)* (Lâminas com fígado, rim e estômago de ratazana com 5 poços)
Ou
2. **504180.25** – 25 x *Rat liver, kidney, stomach slide (10-well)* (Lâminas com fígado, rim e estômago de ratazana com 10 poços)
3. 1 x folheto de instruções

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

Se estão a utilizar apenas as lâminas pode obter os componentes adicionais na INOVA Diagnostics: PBS (508002), controlo negativo IFA Sistema (508186), homogéneo de ANA (504054), mitocondrial (AMA) Padrão (504052), músculo liso (ASMA) Padrão (504053), IgG (H+L) conjugada com FITC (504021, 504071), meio de montagem (504046, 504047), 1% Evans Blue (504049).

Procedimento

Controlo de qualidade

Os controlos positivos e negativos deverão ser utilizados sempre que é testado um lote de amostras.

1. **Meio de montagem.** Retirar o meio de montagem do frigorífico de forma a que este fique à temperatura ambiente (18-28°C) antes de ser utilizado.
2. **Diluir o PBS concentrado.** Diluir o PBS concentrado com água destilada (1 parte de PBS concentrado + 39 partes de água destilada) e misturar bem. O PBS irá servir para diluir as amostras dos pacientes e como tampão de lavagem.

3. **Diluir as amostras do paciente.**
Despiste: Diluir as amostras do paciente 1/20 adicionando 50µL do soro a 950µL de PBS.
Quantificação: Efectuar diluições sucessivas das amostras positivas com tampão PBS (eg. 1/20 1/40, 1/80, 1/160 and 1/320 etc). Por exemplo: Retirar 100µL da diluição 1/20, misturar com 100µL de PBS para dar uma diluição de 1/40. Repetir para outras diluições.
4. **Lâminas substrato.** Deixar as lâminas atingirem a temperatura ambiente (18-28°C) antes de retirá-las dos invólucros. Rotular as lâminas adequadamente, colocá-las na câmara húmida e adicionar uma gota de cada um dos controlos positivo e negativo nos poços adequados. Adicionar 50µL das amostras diluídas nos restantes poços.
5. **Incubação das lâminas.** Incubar as lâminas durante 20 minutos na câmara húmida à temperatura ambiente (18-28°C) e no escuro.
6. **Lavagem com PBS.** Retirar as lâminas da câmara húmida e lavar ligeiramente com o esguicho de PBS. Não deitar o tampão directamente nos poços. Colocar as lâmina num suporte, e emergi-las em PBS, agitar durante 5-10 minutos.
7. **Adição do conjugado fluorescente.** Sacudir o excesso de PBS e em volta dos poços absorver com os discos fornecidos. Colocar as lâminas novamente na câmara húmida e cobrir **imediatamente** cada poço com uma gota de conjugado fluorescente. **NÃO DEIXAR OS POÇOS DESCOBERTOS DURANTE MAIS DE 15 SEGUNDOS.** Se o substrato secar os resultados serão seriamente afectados.
8. **Incubação da lâmina.** Incubar as lâminas durante 20 minutos na câmara húmida à temperatura ambiente (18-28°C) no escuro.
9. **Lavagem com PBS.** Lavar novamente as lâminas como descrito no passo 8.3.6. Contraste opcional. Adicionar até 2-3 gotas de 1% de Azul de Evans por 100mL de PBS antes de emergir as lâminas.
10. **Montagem das lâminas.** Remover uma lâmina de cada vez do PBS. Secar rapidamente os poços e adicionar a cada um uma gota do meio de montagem. Cuidadosamente colocar a lamela, evitando a formação de bolhas de ar, mas se existirem não tente removê-las. Limpar o excesso de meio de montagem em volta da lamela.
11. **Visualização das lâminas no microscópio de fluorescência.** As lâminas podem ser armazenadas até 3 dias a 2-8°C, na escuridão, sem perder significativamente a fluorescência.

Resultados

Controlo de qualidade

O controlo positivo para ANA deverá apresentar um padrão homogéneo verde brilhante nos núcleos das células. O controlo positivo mitocondrial deverá apresentar uma coloração verde-maçã brilhante nos tubulos renais e células gástricas parietais. O controlo positivo músculo liso deverá apresentar coloração verde brilhante na camada muscular do estômago. O controlo negativo deverá apresentar uma coloração verde baço em todos os tecidos, sem fluorescência. Se os controlos não se apresentarem como descrito, o teste está inválido e deverá ser repetido.

Interpretação dos resultados

Resultados negativos

São visualizados com coloração verde baço em todas secções, sem fluorescência. As reacções que se serem fracas devem ser repetidas com uma diluição mais elevada (ex. 1/40). Se os resultados repetidos forem iguais aos originais, o teste é dado como negativo.

Resultados positivos

Estes são vistos com fluorescência bem marcada em áreas específicas do tecido dando um ou mais dos seguintes padrões:

Anticorpos antinucleares (ANA)

Os ANA marcam os núcleos das estruturas seguintes: células hepáticas, túbulos renais distais e proximais, células gástricas parietais e principais. Quase todos os doentes com SLE possuem ANA no seu soro, mas estes podem também ser encontrados em várias doenças do tecido conjuntivo incluindo artrite reumatoide. Os ANA podem também ser encontrados nos casos de hepatite crónica activa e cirrose biliar primária e em resposta a tratamentos com determinadas drogas.

Pode obter-se informação adicional interpretando os padrões nucleares obtidos para os ANA (ver abaixo). É recomendável que todas as amostras positivas para ANA sejam tituladas até ao fim para assegurar que possíveis reacções misturadas sejam detectadas, dado que de outra forma podiam ser perdidas. É aconselhável efectuar outros testes a estas amostras para os autoanticorpos anti-dsDNA e antigénios nucleares extraíveis (ENA).

Padrão	Antigénios comuns envolvidos	Associação a doenças
Homogéneo	ds DNA, histonas	SLE Artrite Reumatoide (AR) Doença do tecido conjuntivo Drogas indutoras de lupus
Periferal (Rim)	Primitivo/ds DNA	SLE
Mosqueado	Antigénios nucleares extraíveis Ribonucleoproteínas, Scl-70, SSB	Escleroderma Síndrome de Sjögren Doença do tecido conjuntivo SLE
Nucleolar	4-6S sRNA	Escleroderma Síndrome de Sjögren SLE, AR e esclerose sistémica progressiva

Padrões de marcação de autoanticorpos específicos do tecido incluem:

Anticorpo	Tecido associado	Principais doenças
Anticorpos anti-mitochondrias (AMA)	Citoplasma do túbulo distal e proximal (numa extensão inferior) Citoplasma de células hepáticas (fígado) e citoplasma de células gástricas parietais (estômago)	Cirrose biliar primária e outras doenças do fígado
Anticorpos anti- músculo liso (ASMA)	Camadas musculares (estômago). Camada muscular das arteriolas (outros tecidos)	Hepatite crónica activa
Anticorpos anti-células gástricas parietais (AGPCA)	Células parietais (estômago)	Anemia perniciosa
Anticorpos anti-reticulina (ARA)	Fibras peritubulares e cápsulas de Bowman (rim). Membranas de células hepáticas e paredes sinusoidais (fígado)	Doença de Crohn Doença celiaca Dermatite herpetiforme

Nota: Cada laboratório deve estabelecer qual o ponto para o qual um resultado positivo é considerado clinicamente significante.

Limitações do Procedimento

- Este teste só por si não pode ser considerado diagnóstico. Todos os outros factores incluindo história clínica dos doentes e outros resultados serológicos ou biópsias também devem ser considerados.
- Os padrões mundam frequentemente à medida que a amostra é quantificada até ao fim. Este fenómeno deve-se à presença de mais do que um anticorpo, especialmente para os ANA.
- Um resultado negativo com este kit pode dever-se à ausência de doença ou à presença de autoanticorpos não detectados por esta técnica.
- A sensibilidade da técnica pode ser influenciada pela fonte de luz, filtros e ópticas de microscópios de fluorescência diferentes. A qualidade do microscópio é significativamente influenciada pela correcta manutenção, especialmente centrando a lâmpada de mercúrio a vapor e mudando-a no período recomendado.
- Os autoanticorpos podem ser activados ou induzidos por várias drogas incluindo contraceptivos orais e antibióticos.
- Dada a curta distância entre os poços nas lâminas com 10 poços, é possível contaminação cruzada de amostras e controlos. Deve ser tomado especial cuidado nomeadamente nos passos de lavagem, para assegurar que tal não aconteça.
- Não foi testado a utilização de reagentes de IFA comercializados por outras casas pelo que não se sabe se são adequados, no entanto a sua utilização não deverá ser necessariamente excluída.

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 e Características de desempenho específicas

Valores de referência

Normais

Anticorpo	Percentagem de ocorrência	Referência
ANA	0-2	2
AMA	0-8	7
ASMA	3	2
ARA	5	8
AGPCA	10-15 (idosos)	9

Anormais

	Diagnóstico clínico	Percentagem de ocorrência	Referência
ANA	SLE	99	4
	Doença do tecido conjuntivo	90	3
	Outras doenças autoimunes (AR, escleroderme, síndrome de Sjögren, dermatomiosite)	15-50	3, 5
AMA	Cirrose biliar primária	>95	3
ASMA	Hepatite crónica	70	3
	Cirrose biliar primária	50	3
ARA	Doença de Crohn	24	6
	Doença celiaca	38-50	3, 6
	Dermatite herpetiforme	22	6
AGPCA	Anemia perniciosa	90	9

Estudo comparativo

Foi feito um estudo comparativo em 96 amostras clínicas utilizando este kit um método de referência comercial. 93 amostras das 96 testadas obtiveram resultados idênticos pelos dois métodos. Para os padrões descritos na secção resultados, a sensibilidade realtiva variou entre os 89-100%, a especificidade relativa foi de 100% em todos os casos e a concordância relativa variou dos 93-100%. Para as amostras que diferiam, obteve-se uma marcação fracamente positiva para os ANA ou SMA em cada caso, com apenas o método de referência, sugerindo que estas amostras estavam na zona limite para aquele padrão e/ou que existe ligeiras diferenças na sensibilidade dos dois métodos.

Sumário do procedimento

1. Equilibrar o meio de montagem para a temperatura ambiente.
2. Diluir o tampão PBS em água destilada.
3. Diluir o soro do doente 1/20 em PBS.
4. Equilibrar as lâminas com substrato para a temperatura ambiente (18-28°C).
5. Aplicar 50µL dos controlos positivo e negativo e do soro diluído nos poços apropriados.
6. Incubar na câmara húmida durante 20 minutos.
7. Lavar durante 5-10 minutos em PBS.
8. Absorver o excesso em volta de cada poço e cobrir imediatamente com uma gota de conjugado.
9. Incubar como no passo 6.
10. Lavar como no passo 7.
11. Montar.
12. Visualizar as lâminas no microscópio de fluorescência.

Referências

1. Tan E M (1989). Antinuclear Antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* **44**, 93-151.
2. Doniach, D, et al. (1986). Tissue antibodies in primary biliary cirrhosis, active chronic (lupoid) hepatitis, cryptogenic cirrhosis and other liver diseases and their clinical implications. *Clin. Exp. Imm* **1**: 237-262.
3. Wallington, T B & Gooi H C (1990). *Clinical Immunology. A practical approach.* Ed. Gooi, H C & Chapel, H. Publ. IRL Press, Oxford UK. 195-220.
4. Cavallaro, J J, et al (1976). Immunofluorescent detection of autoimmune diseases, Immunology Series No. 7. CDC, Atlanta, GA.
5. Seah, P P et al (1971). Antireticulin antibody: Tissue autoantibodies in dermatitis herpetiformis and adult coeliac disease. *Lancet* **1**, 834-836.
6. Seah, P P et al (1973). Antireticulin antibody: Incidence and diagnostic significance. *Gut* **14**, 311-315.
7. Goudie, R B et al (1966). Serological and histological diagnosis of primary biliary cirrhosis. *J. Clin. Path.* **19**, 527-538.
8. Rizzeto, M & Doniach, D (1973). Types of reticulin antibodies detected in human sera by immunofluorescence. *J. Clin. Path.* **26**, 841-851.
9. Bird, A G (1990). *Clinical Immunology. A practical approach.* Ed. Gooi, H C & Chapel, H. Publ. IRL Press, Oxford, UK. Pg.175-194.
10. Weller, TH, Coons, AH (1954). Fluorescent antibody studies with agents of Varicella and Herpes zoster propagated in vitro. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **86**, 789 – 794.
11. 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
info@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

624170PRT

April 2010
Revision 0

