

COD 44510 48 determinações		COD 44514 96 determinações	
COD 44511	12 x 4 determinações	COD 44515	12 x 8 determinações
CONSERVAR A 2-8°C			
Reagentes para a determinação qualitativa de anticorpos antimitocondriais Só para uso <i>in vitro</i> no laboratório clínico			

## ANTI-MITOCHONDRIAL ANTIBODIES (AMA)



## ANTICORPOS ANTIMITOCONDRIAIS (AMA) RIM DE RATO

### FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os anticorpos antimitocondriais (AMA) do soro são unidos aos seus correspondentes antígenos presentes nos cortes do rim de rato. Uma vez unidos, os anticorpos manifestam-se por meio de incubação com um anticorpo contra as imunoglobulinas humanas conjugado com fluoresceína são visualizados por microscopia de fluorescência.

### CONTEÚDO

	COD 44510	COD 44514
A. Lâminas	12 x 4 determinações	12 x 8 determinações
B. PBS (10x)	1 x 100 mL	1 x 100 mL
C+. Controlo Positivo AMA	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 3,5 mL	2 x 3,5 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL	1 x 3 mL
F. Papel absorvente	1 x 12	1 x 12

	COD 44511	COD 44515
A. Lâminas	12 x 4 determinações	12 x 8 determinações

### COMPOSIÇÃO

- A. Lâminas: Cortes de rim de rato (RK-AMA) 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 AMA: Soro humano com anticorpos antimitocondriais (AMA), 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. Mounting Medium. Meio de Montagem: Mowiol 12%, Glicerol 30%, Tris 20 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 contendor, defeitos macroscópicos como raladuras ou descolagens no corte do tecido.

### REAGENTES AUXILIARES

- Cod 44510 e 44514 não precisam de reagentes auxiliares.
- Cod 44511 e 44515 precisam dos seguintes reagentes auxiliares que podem ser adquiridos separadamente:
  - B. PBS (10x).
  - D. FITC/Evans (R), conjugado com contração de azul de Evans.
  - E. Mounting Medium. Meio de Montagem.
- C+. Controlo Positivo AMA.
- C-. Controlo Negativo.

### PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

**PBS:** Efetuar uma diluição a 1/10 do Reagente B com água destilada. Estável 1 mês a 2-8 °C se for conservado à temperatura recomendada, bem fechado e tendo cuidado para evitar contaminações durante a sua utilização.

### 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 1/10 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 1/10.

### 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 das lâminas, tentando cobrir perfeitamente (Nota 1).

3. Incubar as lâminas na câmara húmida durante 30 minutos à temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminar as gotas das amostras inclinando as lâminas e dar pequenos golpes suavemente. Evitar a mistura dos soros.
5. Eliminar o soro restante nas lâminas lavando com PBS (ver a preparação do Reagente). (Nota 2).
6. Lavar as lâminas submergindo-as numa cuvette com PBS durante 5 minutos. Substituir o PBS e repetir a lavagem.
7. Secar cuidadosamente as lâminas utilizando o papel absorvente fornecido. O corte do tecido deve permanecer sempre húmido.
8. 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.
9. Lavar (ver passo 6) e secar (ver passo 7).
10. 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 da zona interna do corte do tecido. A intensidade da fluorescência na periferia do tecido não é representativa da preparação.

Os soros que apresentarem uma fluorescência granular das mitocôndrias no citoplasma das células tubulares renais às diluições recomendadas devem 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 44510 e cod 44514 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

O conjugado FITC/Evans (R) está calibrado face ao Padrão Internacional da OMS de antiimunoglobulinas humanas de ovelha conjugadas com FITC.

A especificidade do Controlo Positivo AMA está verificada em comparação com um soro interno de referência.

### CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

A presença de anticorpos antimitocondriais está associada com a cirrose biliar primária (superior a 95% dos pacientes)<sup>2,3</sup>.

O kit BioSystems anticorpos antimitocondriais foi usado com 95 soros de uma variedade de pacientes auto-imunes assim como doadores sadios. Os resultados aparecem seguidamente:

Doenças	n	Positivo	Negativo
<i>Doenças Hepáticas</i>	<b>46</b>	<b>41</b>	<b>5</b>
<i>Cirrose Biliar Primária</i>	24	22	2
<i>Colangite</i>	10	8	2
<i>Hepatite Auto-imune</i>	12	11	1
<i>Outras Doenças Auto-imunes</i>	<b>25</b>	<b>0</b>	<b>25</b>
<i>Anemia Megaloblástica</i>	3	0	3
<i>Doença Celliaca</i>	7	0	7
<i>Tiroidite</i>	9	0	9
<i>Síndrome de Good Pasture</i>	2	0	2
<i>Outros (vasculite, AFL)</i>	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

1. Evitar tocar o corte 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. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Leung PSC et al. Mitochondrial Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. 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.