



ANTI-SKIN ANTIBODIES (ASA)

COD 44560 48 Determinações	COD 44561 12 x 
CONSERVAR A 2-8°C	
Reagentes para a determinação qualitativa de anticorpos antiepidérmicos Só para uso <i>in vitro</i> em laboratório clínico	

ANTICORPOS ANTIEPIDÉRMICOS (ASA)

Imunofluorescência Indirecta
ESÓFAGO DE MACACO

FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os anticorpos antiepidérmicos do soro unem-se ao seu correspondente antígeno presente no esófago de macaco. O complexo antígeno-anticorpo resultante é detectado através da incubação com um anticorpo contra as imunoglobulinas humanas conjugado com fluoresceína e são visualizados com a ajuda de microscopia de fluorescência¹.

CONTEÚDO

COD 44560	
A. Lâminas	12 x 4 poços
B. PBS (10x)	1 x 100 mL
C-. Controlo Negativo	1 x 0,3 mL
D. FITC/Evans (M)	1 x 2,5 mL
E. Mounting Medium	1 x 3 mL
F. Papel absorvente	1 x 12

COD 44561	
A. Lâminas	12 x 4 poços

COMPOSIÇÃO

- A. Lâminas:** Secções de esófago de macaco.
- 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 Negativo:** Soro humano, azida de sódio 0,95 g/L.
- D. FITC/Evans (M):** Anticorpos de cabra antiimunoglobulinas humanas conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e absorvidos com soro de macaco, 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. No entanto, 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 contentor, defeitos macroscópicos como raladuras ou descolagens na secção do tecido.

REAGENTES AUXILIARES

- Cod 44560 não precisa de reagentes auxiliares.
- Cod 44561 precisa dos seguintes reagentes auxiliares que podem ser adquiridos separadamente:
 - B. PBS (10x).**
 - D. FITC/Evans (M),** conjugado com contração de azul de Evans, ou **FITC (M),** 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 ASA-is:** Anticorpos antiepidérmicos contra a substância intercelular.
 - C+. Controlo Positivo ASA-bm:** Anticorpos antiepidérmicos contra a membrana basal.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

PBS: Efectuar uma diluição 1/10 do Reagente B com água destilada. Estável 1 semana a 2-8°C.

Os demais componentes estão prontos para serem utilizados.

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 1/10 4 em PBS (ver Preparação dos Reagentes) antes do ensaio.

Para a titulação de uma amostra positiva, realizar diluições duplas em PBS a partir da 1/10.

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 da lâmina, tentando cobrir perfeitamente o tecido (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 em uma 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 do tecido deve permanecer sempre húmida.
8. Depositar uma gota do Reagente D em cada poço. Colocar a lâmina em uma 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 a lâmina com um microscópio de fluorescência (250-400x).

É recomendável realizar a leitura imediatamente. Para realizar a leitura, seleccionar campos de observação da zona interna da secção de tecido. A intensidade de fluorescência na periferia do tecido não é representativa da preparação.

A observação da marcação fluorescente específica descrita a continuação deve ser considerada como um resultado positivo à diluição recomendada.

ASA-substância intercelular: Fluorescência no espaço intercelular do epitélio.

ASA-membrana basal: Fluorescência lineal da membrana basal que separa a derme da epiderme.

As amostras positivas podem ser tituladas.

Quando não for observada nenhuma das marcações específicas descritas, o resultado é negativo para os anticorpos indicados.

CONTROLO DE QUALIDADE

Os Controlos Positivos (C+1 y C+2) e o Controlo Negativo (C-) devem ser ensaiados juntamente com as amostras dos pacientes para verificar a funcionalidade do procedimento de ensaio.

Os Controlos Positivos devem proporcionar as marcações específicas descritas no item anterior.

O Controlo Negativo não deve proporcionar nenhuma marcação específica.

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio programa de Controlo de Qualidade interno, assim como procedimentos de correcção no caso dos controlos não cumprirem com as tolerâncias aceitáveis.

CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO

- Os conjugados FITC/Evans (M) e FITC (M) estão calibrados face ao Padrão Internacional da OMS de anti-imunoglobulinas humanas de ovelha conjugadas com FITC.
- Os anticorpos ASA-substância intercelular reconhecem a desmogleína 3, um constituinte dos desmossomos epidérmicos. É uma molécula de adesão pertencente à família das caderinas.
- Os anticorpos ASA-membrana basal unem-se aos antígenos localizados no espaço entre a lâmina densa e o hemidesmossomo, localizado no polo dermal dos queratinócitos basais.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

A presença de anticorpos antiepitérmicos contra o espaço intercelular do epitélio estratificado escamoso é característica de pacientes com pênfigo, pênfigo foliáceo e pênfigo paraneoplástico. Embora os resultados de imunofluorescência indirecta são muito específicos para pênfigo, o tipo de pênfigo não pode diferenciar-se com esta técnica. Em um pequeno porcentagem de pacientes com pênfigo, os anticorpos não podem ser detectados, já que foram unidos à pele do paciente².

Os anticorpos contra a membrana basal encontram-se em 70% de pacientes com penfigóide ampuloso, em 20 – 25% de pacientes com herpes gestatione e em 10% de pacientes com penfigóide cicatricial³.

O kit BioSystems Anticorpos antiepitérmicos foi usado com 91 soros de pacientes com doenças ampulosas assim como doadores sadios. Os resultados aparecem a continuação:

Grupos	n	ASA-is	ASA-bm
Doentes de pênfigo	23	18	0
Doentes de penfigóide ampuloso	18	0	16
Controlos sadios	50	0	0

A sensibilidade da determinação de ASA BioSystems é 78% para o pênfigo e 89% para o penfigóide ampuloso, enquanto que a especificidade é de 100% para ambas doenças.

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 a secção de tecido fixado nos poços durante todo o procedimento.
2. Utilizar um frasco lavagem ou 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. Mascaró JM, Fairley JA, Giudice GJ, Díaz LA. Autoantibodies in pemphigus vulgaris. En: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Giudice GJ and Díaz LA. Autoantibodies in bullous pemphigoid, herpes gestationis and cicatricial pemphigoid. En: En: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.