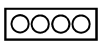
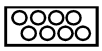
CE

AUTOANTIBODIES-RL/RKm/RS (AA-RL/RKm/RS)

BioSystems
REAGENTS & INSTRUMENTS

COD 44726 12 x 	COD 44739 12 x 
CONSERVAR A 2-8ºC	
Reagentes para a determinação qualitativa de anticorpos auto-imunes Só para uso *in vitro* no laboratório clínico	

AUTO-ANTICORPOS-RL/RKm/RS (AA-RL/RKm/RS)

Imunofluorescência Indirecta

FÍGADO/RIM*(córtex e medula)*/ESTÔMAGO DE RATO

FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os auto-anticorpos do soro dirigidos contra o núcleo (ANA), as mitocôndrias (AMA), o músculo liso (ASMA), as células parietais gástricas (APCA), os microssomos do fígado-rim (LKM), a reticulina e outros, unem-se aos seus correspondentes antígenos presentes na preparação que contém fígado, rim e estômago de rato. O complexo antígeno-anticorpo resultante é detectado através da incubação com um anticorpo contra as imunoglobulinas humanas conjugado com fluoresceína e visualizado por microscopia de fluorescência[1].

CONTEÚDO

	COD 44726	COD 44739
A. Lâminas	12 x 4 poços	12 x 8 poços

COMPOSIÇÃO

A. Lâminas: Secções de fígado, rim (córtex e medula) e estômago de rato.

CONSERVAÇÃO

Conservar a 2-8ºC.

Os reagentes são estáveis até a data de caducidade indicada na etiqueta sempre que se conservem bem fechados e se evite a contaminação durante o seu uso.

Indicações de deterioração:

– Lâminas: Roturas no pacote contentor, defeitos macroscópicos como raladuras ou descolagens na secção do tecido.

REAGENTES AUXILIARES

- Cod 44726 e 44739 precisam dos seguintes reagentes auxiliares que podem ser adquiridos separadamente:

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.

D. FITC/Evans (R): Anticorpos anti-imunoglobulinas humanas conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e adsorbidos com soro de rata, azul de Evans 0,01 g/L, azida de sódio 0,95 g/L; ou **FITC (R)**, sem contratinção de azul de Evans.

E. Mounting Medium. Meio de Montagem: Mowiol 12%, Glicerol 30%, Tris 20 mmol/L, azida de sódio 0,95 g/L.

C+. Controlo Positivo ANA-Ho: Soro humano com anticorpos antinucleares (ANA), padrão homogéneo, azida de sódio 0,95 g/L.

C+. Controlo Positivo ANA-Sp: Soro humano com anticorpos antinucleares (ANA), padrão mosqueado, azida de sódio 0,95 g/L.

C+. Controlo Positivo ANA-Nu: Soro humano com anticorpos antinucleares (ANA), padrão nucleolar, azida de sódio 0,95 g/L.

C+. Controlo Positivo AMA: Soro humano com anticorpos antimitocondriais (AMA), azida de sódio 0,95 g/L.

C+. Controlo Positivo ASMA: Soro humano com anticorpos antimúsculo liso (ASMA), azida de sódio 0,95 g/L.

C+. Controlo Positivo APCA: Soro humano com anticorpos anticélulas parietais (APCA), azida de sódio 0,95 g/L.

C+. Controlo Positivo LKM: Soro humano com anticorpo antifígado-rim microssómico (LKM), azida de sódio 0,95 g/L.

C–. Controlo Negativo. Soro humano, azida de sódio 0,95 g/L.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

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

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 2-8ºC.

Diluir as amostras 1/20 em PBS (ver Preparação dos Reagentes) antes do ensaio.

Para a titulação de uma amostra positiva, realizar diluições duplas em PBS a partir da diluição 1/20.

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 deixar o tecido perfeitamente coberto (Nota 1).
3. Incubar a lâmina na câmara húmida durante 30 minutos à temperatura ambiente (15-30ºC).
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 numa cuvete com PBS durante 5 minutos. Substituir o PBS e repetir a lavagem.
7. Secar cuidadosamente a lâmina utilizando o papel absorvente fornecido. A secção de tecido deve permanecer sempre húmida.
8. Depositar uma gota do Reagente D em cada poço. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar à temperatura ambiente (15-30ºC) 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 preparação com um microscópio de fluorescência (250-400x). É recomendável realizar a leitura imediatamente. Para realizar a leitura, seleccionar campos de observação da zona interior da secção de tecido. A intensidade de fluorescência na periferia do tecido não é representativa da preparação.

A observação da marcação fluorescente específica descrita em seguida indica um resultado positivo à diluição recomendada.

ANA-homogéneo: Fluorescência uniforme e homogénea em todo o interior do núcleo do hepatocito.

AMA: Fluorescência granular das mitocôndrias no citoplasma das células tubulares renais.

ASMA: Marcação da mucosa muscular, das capas de músculo dos vasos sanguíneos e das fibras interglandulares, no estômago do rato.

APCA: Marcação reticular intracelular das células parietais da mucosa gástrica do rato.

LKM: Tipo I. Marcação intensa do citoplasma do hepatocito no fígado e do citoplasma dos túbulos proximales no rim. Túbulos distales negativos.

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

Quando não forem observadas nenhumas 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-) 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

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

A especificidade do Controlo Positivo ANA-Ho está verificada defronte do soro de referência AF/CDC1 dos *Centers for Disease Control /Arthritis Foundation.*

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

ANA: A determinação dos anticorpos antinucleares tem uma sensibilidade superior a 95% para o lúpus eritematoso sistémico, e uma baixa especificidade[2].

AMA: A presença de anticorpos antimitocondriais é associada com a cirrose biliar primária por cima de 95% dos pacientes[3,4].

ASMA: Os anticorpos antimúsculo liso encontram-se no soro de um 52-85% dos pacientes com hepatite activa crónica auto-imune e num 22% dos pacientes com cirrose biliar primária[5,6].

APCA: Os anticorpos anticélulas parietais encontram-se num 90% dos pacientes com anemia perniciosa, associada normalmente com outras doenças auto-imunes específicas do tecido[7].

LKM: Os anticorpos antiLKM tipo I são considerados marcadores da hepatite auto-imune tipo II[8].

O kit BioSystems Auto-anticorpos-RL/RKm/RS foi usado com 188 soros de uma variedade de pacientes com doenças auto-imunes assim como doadores sadios. Os resultados aparecem seguidamente:

Doenças	*n*	*ANA*	*AMA*	*ASMA*
Doenças hepáticas	***46***	-	***41***	***17***
Cirrose biliar primaria	*24*	-	*22*	*5*
Colangite	*10*	-	*8*	*4*
Hepatite Auto-imune	*12*	-	*11*	*8*
Doenças do tecido conectivo	***93***	***93***	-	-
Lúpus eritematoso sistémico	*31*	*31*	-	-
Síndroma de Sjögren	*11*	*11*	-	-
Esclerodermia	*7*	*7*	-	-
Síndroma CREST	*3*	*3*	-	-
Artrite reumatóide	*11*	*11*	-	-
Dermatopolimiosite	*2*	*2*	-	-
Outros	*28*	*28*	-	-
Outras doenças auto-imunes	***25***	***0***	***0***	***0***
Anemia Megaloblástica	*3*	*0*	*0*	*0*
Doença Celíaca	*7*	*0*	*0*	*0*
Tiroidite	*9*	*0*	*0*	*0*
Síndroma de Good Pasture	*2*	*0*	*0*	*0*
Outros (vasculite, AFL)	*4*	*0*	*0*	*0*
Controlos sadios	***24***	***0***	***0***	***0***

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 as secções 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. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Leung PSC et al. Mitochondrial Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. 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.
5. Whittingham S and Mackay IR. Smooth muscle autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
6. Jacob G and Schoenfeld Y. Actin autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
7. Gleeson PA et al. Parietal Cell Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996
8. Homberg JC, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. Hepatology 1987;7(6):1333-9.