

INSTRUÇÕES DE USO

HEMAGEN® VIRGO®

ANTICORPO ANTIMÚSCULO LISO E ANTICORPO ANTICÉLULA PARIETAL- (SMA) and (PCA)-
Imunofluorescência

Cat. No. 904240 - 48 testes

Cat. No. 904250 - 96 testes

USO DO PRODUTO

Este kit é usado para a detecção dos anticorpos anticélula parietal (ACP) e antimúsculo liso (SMA) em um sistema de teste de imunofluorescência indireta na pesquisa de doenças auto-imunes no soro humano.

RESUMO, EXPLICAÇÃO E PRINCÍPIO DO TESTE

A utilização de substrato de estômago de rato permite detectar simultaneamente os anticorpos anticélula parietal (PCA) e antimúsculo liso (SMA) em um sistema de teste de imunofluorescência indireta.

PRINCÍPIO

Os anticorpos antimúsculo liso (AML) podem ser demonstrados nos pacientes com hepatite crônica e aguda, os títulos mais altos ocorrem na hepatite crônica ativa (HCA). Todas as formas de doenças crônicas do fígado apresentam títulos altos de AML, não superiores a 1:60 (exceto para HCA onde são encontrados títulos de até 1:1280).

O diagnóstico diferencial da HCA em pacientes com doença crônica do fígado é facilitado pela titulação do AML usando o método de imunofluorescência com mucosa muscular de estômago de rato como substrato.

Existem várias formas de doenças agudas e crônicas do fígado que estão diretamente ou indiretamente relacionadas à infecção por hepatite B (HB). Ambos os marcadores: viral ou anticorpos podem ser úteis para classificar os diferentes subgrupos de HCA e tem sido demonstrado que a maioria de pacientes HB-antígeno negativos são AML positivos.

Os anticorpos antinucleares (ANA), AML e AM ocorrem na HCA e formam a base da distinção de grupos diferentes de hepatites auto-imunes. Os pacientes com HCA que são ANA e AML positivos têm altos títulos destes auto-anticorpos que são bem demonstrados por técnicas de imunofluorescência³¹⁻³³.

Os testes de AML são utilizados na confirmação do diagnóstico de aproximadamente 70% destes casos de HCA². Uma vez que os AML são geralmente negativos no LES, um teste de AML positivo exclui o Lupus Eritematoso Sistêmico. Os AML são também encontrados em aproximadamente 50% de pacientes com cirrose biliar primária (CBP) e até 28% de pacientes com cirrose criptogênica²⁸. A alta incidência de AML tem sido reportada no soro de pacientes com infecções por mononucleoses. Os AML têm sido detectados nos estados de doenças tais como carcinoma de mama, melanoma maligno e carcinoma ovariano⁷.

Os AML são raramente encontrados (menos de 2%) em pacientes com obstrução do duto biliar, cirrose alcoólica, LES e em população normal. Estômago de rato é utilizado para a detecção de AML neste sistema de teste.

A reação de AML envolve anticorpos circulantes para um componente normal das células do músculo liso. Estes anticorpos não são órgão ou espécie específicos e podem ser encontrados nos tecidos com áreas de músculo liso. Eles são primeiramente da classe de IgG das imunoglobulinas mas podem ocorrer também como IgM.

Várias pesquisas mostram que o antígeno ativo na reação de AML é a actina. A actina é encontrada em tais estruturas histológicas como: parede capilar, plaquetas, epitélio do tubo renal e células glomerulares renais. Estes anticorpos não são órgãos específicos e irão reagir com as artérias ao redor do músculo liso, veias e outras estruturas histológicas contendo actina. A reatividade de AML de pacientes com HCA é ampla e inclui muitos destes tecidos “não-musculares”. Os AML podem ser específicos para actina ou não e é o precedente que está associado com o HCA. Entretanto, estudos usando fibroblastos cultivados reafirmam a especificidade da actina dos AML de pacientes com HCA. As tentativas em classificar os AML por diferentes padrões de imunofluorescência não forneceram ainda uma correlação clínica entre distintas doenças e um padrão de fluorescência particular. A fluorescência das células da mucosa gástrica (células da parede ou principais) e/ou coloração no soro positivo de ANA não deverá ser reportado como reação de AML positiva^{10,12}.

Anticorpos Anticélulas Parietais (ACP): doenças gástricas auto-imunes têm sido classificadas nas gastrites do Tipo A e Tipo B (baseado nas mudanças morfológicas da porção final e anterior do estômago). Pacientes com anticorpos anticélulas parietais (ACP) ou antifator intrínseco (ou ambos) têm atrofia da mucosa da porção final (Tipo A) e uma taxa muito alta de anemia perniciosa (que está freqüentemente associada com outras doenças endócrinas auto-imunes). Um ACP positivo na presença de uma anemia megaloblástica faz com que a anemia perniciosa seja um provável diagnóstico. Na gastrite do Tipo B, as ACP são insuficientes e não há nenhuma associação com anemia perniciosa ou doenças endócrinas auto-imunes⁴.

O método de imunofluorescência indireta é o teste de escolha para a detecção do ACP. A IF é mais sensível que o método de FC. A mucosa gástrica do estômago de rato é utilizada para a detecção de ACP neste sistema de teste.

A incidência de ACP em pacientes com anemia perniciosa é 93%. Outras condições além da anemia perniciosa podem dar positivas para os resultados de ACP: atrofia gástrica, diabete mellitus, doença de Hashimoto, úlcera gástrica, tirotóxicose, miastenia grave, anemia por deficiência de ferro, doença idiopática de Addison, mixedema primário, síndrome de Sjögren e artrite reumatóide. Em população normal, os ACP variam de 2% (em um grupo de 20 anos) a 16% (em um grupo de 60 anos)¹⁵.

Os ACP deverão ser incluídos em um grupo diferencial de pacientes com anemia megaloblástica uma vez que 93% dos pacientes com anemia perniciosa serão detectados⁴³. A reação de ACP envolve anticorpos circulantes para os componentes intercitoplasmáticos das células parietais. Os ACP são órgãos específicos e não espécie específica. Entretanto, os anticorpos antimitocondriais (AM) não são órgãos específicos e irão reagir com as células parietais e se assemelham aos ACP. Para diferenciar os ACP dos AM, a amostra que exhibe fluorescência ao ACP deverá ser testada com setores de rim de rato. Um ACP verdadeiro não mostrará fluorescência tubular renal enquanto que um AM irá reagir com ambas células: parietais e tubulares do rim^{16,17}.

Estudos recentes demonstraram uma técnica recente na detecção de ACP. Anticorpos antimúsculo liso (AML) de pacientes com hepatite crônica ativa (HCA) ligam-se às células parietais em um padrão de imunofluorescência indistinguível do ACP. Por isso, para diferenciar um verdadeiro ACP de uma reação AML, a amostra que exhibe fluorescência ao ACP deverá ser testada para a coloração positiva na mucosa muscular. O ACP verdadeiro não irá exibir fluorescência da mucosa muscular do estômago, mas um AML pode reagir com ambas células: mucosas e parietais¹⁸.

Para facilitar este tipo de diferenciação a Hemagen oferece componentes de lâminas contendo dois, três e quatro setores de tecidos por poço que permitem a diferenciação imediata das reações da tireóide, assim como ACP da reação dos AML não específicos do órgão em um mesmo poço.

O ACP é primeiramente IgG mas pode ocasionalmente ser encontrado frações de imunoglobulinas IgM.

MATERIAIS FORNECIDOS

1. Conjugado FITC

01 frasco com 3,0 ml contendo conjugado anti-humano marcado com FITC contendo Azul de Evans. Este reagente contém anticorpos que irão reagir com as classes de imunoglobulinas humanas IgG, IgM e IgA. Deve ser armazenado de 2°-8°C. O conjugado é estável a esta temperatura até a data de vencimento.

2. Lâminas de antígeno:

12 (doze) lâminas contendo antígenos de setores de estômago de rato. Devem ser armazenadas de 2°-8°C ou menos. Confira o rótulo para data de vencimento específica.

3. Controles Positivos:

01 frasco com 1.0 ml de controle positivo de AML em soro humano, 01 frasco com 1.0 ml de controle positivo de ACP em soro humano. Devem ser armazenados de 2°-8°C ao receber. Confira o rótulo para a data específica de vencimento.

4. Controle Negativo Universal

01 frasco com 1.0 ml de controle negativo universal em soro humano. Deve ser armazenado de 2°-8°C. Confira o rótulo para a data específica de vencimento.

5. Envelope de Tampão

01 envelope contendo Salina Tamponada de Fosfato (PBS). É estável quando armazenado à temperatura ambiente durante 2 anos. Confira o rótulo para vencimento específico. O tampão reconstituído não contém preservativos e deverá ser armazenado de 2°-8°C. Deverão ser tomados cuidados para evitar contaminação.

6. Meio de Montagem

01 frasco com 2 ml do Meio de Montagem. Deverá ser armazenado de 2°-8°C. Confira o rótulo para a data do vencimento específico.

MATERIAIS REQUERIDOS MAS NÃO FORNECIDOS

Estante de tubo de teste
Pipetas descartáveis.
Placa de coloração e pinça de lâminas.
Microscópio de fluorescência
Câmara úmida
Frasco Volumétrico (500 mL)
Água destilada
Lenço de papel - gase

ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE

Todos os componentes do kit deverão ser armazenados de 2° - 8°C e são estáveis até a data de vencimento escrito no rótulo.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

- Este kit é destinado **somente para uso diagnóstico *in vitro***.
- Todos os componentes de soro humano foram testados por radioimunoensaio para HBsAg e HTLV-III/LAV e por um método aprovado pelo FDA e foram negativos (não repetidamente reativos). Entretanto, isto não assegura a ausência de HBsAg e HTLV-III/LAV. Todos os componentes de origem humana deverão ser manuseados com cuidado apropriado.
- A azida sódica (0,01%) incluída nos controles e conjugados é tóxica se ingerida.
- Não usar os componentes fora da data de vencimento.
- Siga as instruções do procedimento à risca como é recomendado nesta instrução para assegurar exatamente se os resultados são válidos.
- Manuseie as lâminas pelas extremidades, pois a pressão direta nos poços de antígenos pode danificar o antígeno.
- Uma vez que o procedimento se inicie não permita que o antígeno nos poços seque. Isto pode resultar em falsos resultados de teste negativos ou artefatos desnecessários.

COLETA, ARMAZENAMENTO E MANUSEIO DA AMOSTRA

Deverá ser colhida amostra de soro usando condições assépticas. Deverá evitar hemólise usando separação imediata do soro do coágulo. Deverá ser armazenado de 2°-8 °C se for analisado dentro de poucos dias. O soro pode ser mantido por 3 a 6 meses quando armazenado a -20°C ou menos. Deverão ser evitadas amostras lipêmicas ou muito hemolisadas. Quando as amostras forem transportadas à temperatura ambiente, é recomendado adicionar um preservativo com 0.01% timerosal ou 0,1% de azida sódica.

PROCEDIMENTO DO TESTE

PREPARAÇÃO DOS REATIVOS

Permita que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente por 15 a 30 minutos antes do uso.

1. Conjugado FITC: Pronto para o uso em frascos de conta-gotas com 3,0 ml do conjugado líquido na diluição de trabalho.
2. Controles Positivos de AML e ACP: Prontos para usar em frasco de conta-gotas com 1,0 ml de controle líquido na diluição de trabalho.
3. Controle Negativo Universal: Pronto para usar em frasco de conta-gotas com 1.0 ml de controle líquido na diluição de trabalho.
4. Envelope de Tampão: Dissolva o conteúdo do envelope em 1 litro de água destilada ou deionizada. Fechar bem para prevenir contaminação ou evaporação.

PROCEDIMENTO

Pesquisa: Dilua o soro teste a 1:20 em PBS.

Titulação: a 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, etc. Prepare diluições seriadas de dois passos com PBS.

As amostras podem conter agentes infecciosos e deverão ser manuseadas adequadamente.

Para obter ótimos resultados, NÃO permita que os poços de substrato ressequem enquanto executa o teste.

1. Remova as lâminas e os reagentes requeridos do refrigerador e deixe-os atingir a temperatura ambiente (15 a 30 minutos).
2. Remova as lâminas da embalagem apenas antes do uso e rotule.
3. Dilua as amostras com PBS a uma diluição de 1:20 ou prepare diluições seriadas de dois passos para a determinação quantitativa, começando com a diluição de 1:20.
4. É necessários testar 1 Controle Positivo, 1 Controle Negativo e 1 Controle de PBS para cada bateria de lâminas de teste.
5. Cubra cada poço com as amostras diluídas ou controles.
6. Incube em uma câmara úmida de 23 +/- 2°C por 30 minutos.
7. Enxágüe as lâminas rapidamente com um leve fluxo de PBS. Não dirija o fluxo direto nos poços.
8. Enxágüe as lâminas completamente por 5 minutos em uma placa de coloração de PBS. Troque o tampão e lave por 5 minutos a mais. Manuseie as lâminas levemente.
9. Seque a parte pintada da lâmina com os mata-borrões fornecidos. Não deixe os poços secarem antes da adição do conjugado.
10. Cubra cada poço com uma gota do conjugado FITC.
11. Incube em uma câmara úmida de 23 +/- 2°C por 30 minutos. Proteja da luz intensa.
12. Repita os passos 7 e 8. Seque a parte pintada da lâmina com os mata-borrões, não deixe os poços secarem antes da adição do Meio de Montagem.
13. Coloque uma gota do Meio de Montagem em cada poço e cubra com uma lamínula.
14. Para melhores resultados, as lâminas deverão ser lidas imediatamente a uma magnitude de 200-500X.
Alternativamente, as lâminas podem ser lidas dentro de 24 horas. Porém, elas devem ser armazenadas de 2°- 8°C no escuro em uma câmara úmida fechada para prevenir que o fluido de montagem seque.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

AML

A HCA é uma doença crônica do fígado, afetando principalmente mulheres jovens, mas também afeta indivíduos de ambos os sexos de todas as idades. É caracterizada na biópsia de fígado pela deterioração das suas funções devido à necrose das células parenquimais hepáticas nas áreas das infiltrações da célula do plasma e células linfocíticas.

Um resultado positivo é observado como brilhante, coloração citoplasmática difusa das camadas do músculo liso da mucosa muscular encontradas no estômago de rato. A fluorescência também pode ser evidente nas paredes capilares da camada gástrica e artérias ou veias. A fluorescência de outros antígenos celulares tais como núcleo, células parietal ou tecido conjuntivo não deverá ser reportado como AML positivos.

Interpretação do Título

O título de ponto final é a diluição mais alta do soro do paciente que apresenta uma fluorescência fraca (+1) da mucosa muscular.

Menos que 1:20 - Normal, negativa

1:20 - 1:80 - Positiva, sugestiva de doenças do fígado. Repetir com amostras frescas após duas semanas.

1:160 ou maior - Sugestiva de hepatite crônica ativa.

Os títulos na HCA podem reagir a 1:640. Entretanto, eles geralmente variam de 1:80 a 1:320 e persistem por anos. Na hepatite viral os títulos são geralmente abaixo de 1:80 e são transitórios. Os títulos na CBP são também baixos, variando de 1:10 a 1:40.

ACP

A anemia perniciosa é uma anemia megaloblástica. Um teste positivo de um paciente com anemia perniciosa ajuda a estabelecer um diagnóstico presumível de anemia perniciosa ou anemia perniciosa associada com uma segunda doença. Os testes confirmatórios adicionais para anemia perniciosa são: anticorpos para a absorção do fator intrínseco da vitamina B12 ou atividade da vitamina B12 no soro. Um fator chave na diferenciação entre a anemia perniciosa e a gastrite atrófica é a perda dos anticorpos do fator intrínseco na gastrite atrófica⁴³.

Pode assumir algumas formas de gastrites atróficas baseado somente na ACP. Isto pode não ser relacionado à anemia perniciosa. As ACP são geralmente associadas com alguns graus de hipocloridria⁴².

Em adição a este diagnóstico potencial, o teste de ACP é útil na pesquisa de grupos de alto risco determinado geneticamente (ex. Parentes de pacientes com doenças da tireóide e pacientes com anemia perniciosa) para gastrites atróficas crônicas assintomáticas e para o reconhecimento precoce de gastrites atróficas e anemia perniciosa⁴⁶.

Um resultado positivo é observado quando aparece uma fluorescência citoplasmática granular brilhante das células parietais da mucosa gástrica de rato. A fluorescência de outros antígenos celulares tais como núcleo, músculo liso, ou tecido conjuntivo deverá ser reportado como ACP positivo.

Interpretação do Título

O título de ponto final é a diluição mais alta do soro do paciente que apresenta uma fluorescência fraca (+1) da célula parietal.

“A significância clínica dos títulos de ACP não tem nenhuma relação com a severidade e duração do estado da doença. Devido a isto não se pode predizer baseado somente no título de ACP o grau de secreção prejudicada do fator intrínseco ou a extensão das mudanças histopatológicas”. (Detecção da Imunofluorescência de Doenças Auto-ímmunes. Série Imunológica No. 7, U.S.D.H.E.W. CDC. 1976. p66).

LIMITAÇÕES

AML

1. Nenhum diagnóstico deverá ser baseado em um simples resultado de teste sorológico, uma vez que vários fatores devem ser levados em consideração.
2. O AML deverá ser usado como um auxílio no diagnóstico de doenças do fígado.
3. As manifestações clínicas tais como biópsias do fígado e testes da função do fígado deverão ser considerados no diagnóstico final das hepatites ativas crônicas.
4. O AML pode ser encontrado em: cirrose biliar primária (CBP), cirrose criptogênica, mononucleose infecciosa, asma, febre amarela, hepatite infecciosa, carcinoma de mama, melanoma maligno e carcinoma ovariano.

ACP

1. Nenhum diagnóstico deverá ser baseado em um simples resultado de teste sorológico, uma vez que vários fatores devem ser levados em consideração.
2. Os testes de confirmação adicional para anemia perniciosa são: anticorpos para fator intrínseco, absorção da vitamina B12 e atividade da vitamina B12 no soro.
3. O ACP deverá ser usado como um diagnóstico adicional no estabelecimento de anemia perniciosa como a causa de anemia megaloblástica.
4. O ACP pode ser encontrado em 16% dos indivíduos aparentemente normais no grupo de idade ao redor de 60 anos.
5. Condições outras que não a anemia perniciosa pode dar resultados positivos para ACP.

6. A presença de auto-anticorpos antifator intrínseco é considerada diagnóstico de anemia perniciosa e para casos raros de doenças endócrinas associadas com atrofia gástrica⁴⁶.
7. Pacientes com Dermatites herpetiformes podem ter ACP sem qualquer evidência de má absorção de vitamina B12.⁴⁷

CONTROLE DE QUALIDADE

1. Os Controles de soro positivos e negativos devem ser incluídos em cada dia de teste para confirmar a reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade do procedimento de teste.
2. O controle negativo deverá exibir uma pequena ou nenhuma fluorescência. Se a fluorescência for verde-maçã luminosa, o teste é inválido e deverá ser repetido.
3. O controle positivo representa uma forte (3+ - 4+) reação. Se a intensidade de fluorescência do controle positivo for menor que a faixa aceitável, o teste é inválido e deverá ser repetido.
4. Em adição aos soros controles positivo e negativo, deverão ser ensaiados o controle PBS para estabelecer se o conjugado é livre de coloração não específica do substrato do antígeno. Se o antígeno apresenta uma fluorescência no controle de PBS, repetir usando um conjugado fresco. Se o antígeno ainda estiver fluorescente, o conjugado ou o antígeno pode estar com problemas.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

As características de desempenho do kit de Anticorpos Anti-Músculo Liso e Anticorpos Anticélula Parietal foi determinada testando múltiplos lotes com um painel de soro referência disponível do Centro de Controle de Doenças. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com outros substratos comercialmente disponíveis. Os resultados mostram que os resultados para o Teste de Anticorpos Anti-Músculo Liso e Anticorpos Anticélula Parietal estiveram dentro da faixa reportada nos estudos da CDC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Feely RH: Systemic Lupus Erythematosus: A review. Rheuma rehab 17:79-82, 1978.
2. Burnham TK: Antinuclear antibodies II. The prognostic significance of nuclear immunofluorescent patterns in lupus erythematosus. Arch Dermatol. 11:203-7, 1975.
3. Greenwald CA, Peebles CL and Nakamura RM: Laboratory tests for antinuclear antibody (ANA) in rheumatic disease. Lab Med 9:19-23, 1978.
4. Nisengard RJ: Antinuclear antibodies: Significance of titers. In: Immunology of the Skin, EH Beutner, TP Chorzelski and SE Bean, Eds. 2nd Edition, John Wiley and Sons, p. 387-98, 1979.
5. Barnett EV: Immunofluorescence tests in immune technics and applications. Am J Clin Path 68:6622-3, 1977.
6. Lowenstein MB and Rothfield NF: Family study of systemic Lupus Erythematosus. Arth Rheum 20:1293-1303, 1977.
7. Cavallaro JJ., Palmer DF and Bigazzi PF: Immunofluorescence detect autoimmune diseases. Immunology Series No. USDHEWPHSCDC, 1977.

TERMO DE GARANTIA

Este kit como um todo tem garantia de troca, desde que esteja dentro do prazo de validade e seja comprovado pela Assessoria Científica da HEMAGEN DIAGNÓSTICOS de que não houve falhas técnicas na execução, manuseio do teste e na conservação do produto.

IMPORTADO E DISTRIBUÍDO POR:

HEMAGEN DIAGNÓSTICOS COM. IMP. EXP. LTDA.

Rua Doutor Diogo de Faria, 109

São Paulo - SP – CEP 04037-000

Fone: (11) 3819.5222. Fax: (11) 3816-7623

CGC: 64.002.686/0001-32

Resp. Técnico: Dhália Gutemberg CRF 07.183 - SP

FABRICADO POR:

HEMAGEN DIAGNOSTICS, INC.
VIRGO® PRODUCTS DIVISION
Columbia, Maryland 21045 - USA
Fone: (800) 436-2436 ou 617-890-3748.

SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE

Quaisquer dúvidas técnicas, no manuseio deste kit ou no seu procedimento entrar em contato com a ASSESSORIA CIENTÍFICA DA HEMAGEN DIAGNÓSTICOS, que estará sempre à disposição para auxiliar quando ocorrerem dificuldades na utilização de seus produtos. Contate a HEMAGEN através do seguinte endereço:

HEMAGEN DIAGNÓSTICOS COM. IMP. EXP. LTDA.
Rua Doutor Diogo de Faria, 109
São Paulo - SP - CEP 04037-000
Fone: (11) 3819.5222. Fax: (11) 3816-7623

DATA DA REVISÃO DAS INSTRUÇÕES DE USO

Documento Revisado em: Março de 2014.