

INSTRUÇÕES DE USO

HEMAGEN®VIRGO

TESTE DE PESQUISA DE AUTO-IMUNE - PAINEL 2

Imunofluorescência

Cat. No. 904080 - 48 testes - Estômago/Rim/Fígado de Rato

Cat. No. 904090 - 96 testes - Estômago/Rim/Fígado de Rato

USO DO PRODUTO

Este kit é usado para a detecção dos anticorpos antinucleares circulantes (ANA), antimitocondrial (AM), anticélula parietal (ACP) e antímúsculo liso (AML) 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 do Painel de Pesquisa de Auto-anticorpos Fluorescentes da VIRGO irá detectar simultaneamente os anticorpos antinucleares circulantes (ANA), antimitocondrial (AM), anticélula parietal (ACP) e antímúsculo liso (AML) em um sistema de teste de imunofluorescência indireta. Todos os substratos de tecido necessários estão contidos em cada poço da lâmina deste sistema para executar a pesquisa do anticorpo.

PRINCÍPIO

Os testes Antinucleares (ANA) são comumente executados no soro de pacientes com várias doenças do tecido conjuntivo (particularmente no lupus eritematoso sistêmico -LES) para evidenciar o diagnóstico, prognóstico significativo, e acompanhamento da terapia. Os títulos mais altos de ANA são encontrados no LES ativo. A presença destes anticorpos é a segunda manifestação mais comum do LES³. A imunofluorescência é o teste de escolha para a pesquisa da presença de ANA, uma vez que detecta de 95-100% dos casos ativos de LES⁵.

A presença de ANA foi bem documentada em diferentes estados de doença como também em parentes saudáveis de pacientes com LES.

A incidência de ANA positiva varia com cada doença. O fígado/rim de rato é utilizado para a detecção neste sistema de teste^{4,6,7}.

Os ANA, AM & anticorpos AML não são órgãos ou espécies específicos. A reação do teste primário envolve a presença de anticorpos circulantes no soro do paciente que se ligam aos seus antígenos homólogos. Isto acontece durante o período de incubação enquanto o soro cobre a superfície do antígeno. Uma reação secundária segue um período de enxágüe que remove todo o anticorpo humano não ligado. O reagente usado na reação secundária é a globulina anti-humana conjugada à fluoresceína. A reação é visualizada com um microscópio de fluorescência apropriado para vários padrões morfológicos.

O significado clínico de vários padrões de imunofluorescência nuclear é útil na avaliação de pacientes com a presença de doenças de tecido conjuntivo. O padrão homogêneo é o padrão mais comum e está associado com o LES. O padrão periférico confirma um diagnóstico clínico de LES. A fluorescência nuclear pontilhada é vista em Esclerodermia, doenças de Reynaud, Artrites Reumatóides e Síndrome de Sjogren. A fluorescência nuclear é vista principalmente em Esclerodermia e Síndrome de Sjogren^{1,2}.

Foi reportado que várias drogas induzem ou ativam o LES. Pacientes que tomam estas drogas frequentemente demonstram níveis variáveis de ANA no seu soro⁸.

Os Anticorpos Antimitocondriais (AM) são anticorpos circulantes em doenças crônicas do fígado. E são de grande importância clínica no diagnóstico diferencial de hepatites crônicas ativas (HCA), das hepatites crônicas persistentes (HCP). O AM é particularmente útil no diagnóstico de cirroses biliares primárias (CBP).

Os testes para a detecção de anticorpos antimitocondriais (AM) são recomendados como uma alternativa para a exploração cirúrgica, como a presença de altos títulos de AM pode fornecer evidência confirmatória para o diagnóstico de CBP¹³. Ambas HCA e CBP têm muitas características imunológicas de sobreposição e podem

representar uma contínua existência de uma simples doença. Os títulos de AM na HCP não parecem ter qualquer correlação com a atividade clínica, uma vez que eles não variam com a severidade ou progressão da doença. Entretanto, os títulos de AM não servem como um monitor da resposta à terapia primária ou fornece informação prognóstica^{19,20}.

O AM está presente no soro de pacientes com uma variedade de doenças do fígado. Entretanto, eles estão presentes somente em altos títulos na maioria dos pacientes com CBP. Recentes estudos têm demonstrado que os títulos de AM maiores que 1:40 são encontrados somente em pacientes com CBP^{16,21,24}.

A detecção de AM pela técnica de imunofluorescência indireta é muito útil no diagnóstico diferencial da obstrução extra-hepática em que menos de 2% de pacientes possuem este anticorpo e somente em baixos títulos. O rim de rato é utilizado para a detecção de AM neste sistema.

A reação de AM envolve anticorpos circulantes que se ligam à membrana de lipoproteína interna e à crista da mitocôndria. Estes anticorpos não são específicos de órgão ou tecido e podem ser encontrados em muitos tecidos diferentes que possuem mitocôndria. As células ricas em mitocôndria se alinham nos tubos proximais e distais do rim de rato que é usado como substrato do teste nos procedimentos de imunofluorescência indireta. Os AM são primeiramente da classe IgG, mas também podem incluir IgA e IgM^{17,18}.

Considerando que os AM reagem com os tubos do rim, das células epiteliais e células parietais do estômago, a Hemagen oferece duas apresentações por poço para ajudar na diferenciação de anticorpos específicos de órgão: de rim/estômago e de rim/estômago/fígado/tireóide (Cat. No. 904160)²⁵.

A fluorescência citoplasmática granular brilhante dos tubos renais indica um resultado positivo. A fluorescência de outros antígenos celulares tais com núcleo, músculo liso, tecido conjuntivo ou uma fluorescência não granular limitada para a porção central dos tubos proximais não serão reportados como positivos para AM¹⁵.

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 de AML não superiores a 1:160 (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 e 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 positivo.

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 muito bem demonstrados por técnicas de imunofluorescência³¹⁻³³.

Os testes de AML são utilizados na confirmação do diagnóstico de aproximadamente 70% destes casos de HCA²⁷. 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 mononucleose. Os AML têm sido detectados nos estados de doenças tais como carcinoma de mama, melanoma maligno e carcinoma ovariano³².

Os AML são raramente encontrados (menos que 2%) em pacientes com obstrução do ducto 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 específicos para órgão ou espécie 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 específicos do órgão 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 deverão ser reportadas como reação de AML positiva^{35,37}.

Anticorpos Anticélulas Parietais (ACP): doenças gástricas auto-imunes têm sido classificadas em gastrites do Tipo A e Tipo B (baseadas nas mudanças morfológicas da porção final e anterior do estômago). Pacientes com anticorpos para as células parietais (ACP) ou fator intrínseco (ou ambos) tem atrofia da mucosa da porção final (Tipo A) e uma taxa muito alta de anemia perniciosa (que está frequentemente 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-imunes⁴⁴.

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 de 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 gravis, anemia por deficiência de ferro, doença idiopática de Addison, mixedema primário, síndrome de Sjögren e artrites reumatóides. Em população normal, os ACP variam de 2% (em um grupo de 20 anos) a 16% (em um grupo de 60 anos)⁴¹.

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 específicos do órgão, mas não específico da espécie. Entretanto, os anticorpos antimitocondriais (AM) não são específicos dos órgãos 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 na parte que contém 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^{42,43}.

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 parietais⁴³.

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 AM não específico do órgão em um mesmo poço.

O ACP é primeiramente IgG mas podem ocasionalmente ser encontradas frações de imunoglobulinas IgM.

MATERIAIS FORNECIDOS

1. Conjugado FITC :

01 frasco com 3,0 ml contendo conjugado anti-humano marcado com FITC e 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 ao receber. O conjugado é estável a esta temperatura até a data de vencimento.

2. Lâminas de antígeno:

12 (doze) lâminas contendo setores de rim/estômago/fígado de rato. Devem ser armazenadas de 2-8°C ao receber. Confira o rótulo para data de vencimento específica.

3. Controles Positivos:

01 frasco com 1.0 ml de controle positivo de ANA (Homo) em soro humano, 01 frasco com 1.0 ml de controle positivo de AM em soro humano e 01 frasco com 1.0 ml de controle positivo de AML em soro humano. Deve ser armazenado 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 ao receber. 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 ou sistema de microtítulo.

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 exatamente 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 uma separação 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% de 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 ANA, AM e AML: 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. São 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

ANA

Um resultado positivo é observado quando um dos quatro padrões básicos aparecerem individualmente ou em várias combinações. As características padrões são melhores observadas quando visualizadas usando objetivas altas e secas.

1. Homogêneo (Difuso): Liso, é observada uma fluorescência levemente difusa dos núcleos inteiros.
2. Periférico (Borda rugosa): A membrana do núcleo é mais intensamente fluorescente que a área central.
3. Pontilhado - São observados numerosos “pontos” pequenos de fluorescência através do núcleo.
4. Nucleolar - Os nucléolos são uniformemente corados e aparecem com 1 a 5 áreas esféricas grandes de fluorescência corada através dos núcleos.

Padrão de interpretação

ANA: O padrão de imunofluorescência nuclear encontrado no LES pode ser de prognóstico significativo.

Periférico: Confirma o diagnóstico clínico de LES. Envolvimento renal, confirmado pelos testes de antiDNA, está associado com um prognóstico intermediário.

Homogêneo: Um alto título de anticorpos antiDNA sugere LES com provável envolvimento renal e está associado com um prognóstico intermediário.

Pontilhado: Grandes e pequenos pontos observados no LES benigno e associado com bons prognósticos.

Nucleolar: Os títulos altos estão associados com a Síndrome de Sjögren e Esclerodermia.

Interpretação do Título

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

Menos que 1:20 - Normal: virtualmente exclui o fato do paciente com LES ativo não estar sob terapia imunossupressoras ou em remissão.

1:20 - 1:80 - Teste positivo freqüentemente encontrado na AR e outras doenças do tecido conjuntivo. Deverá ser testada uma amostra fresca após duas semanas. Se os títulos aumentarem, é sugerido o LES. Nenhuma mudança no título indica outras possíveis doenças auto-imunes em uma condição estática, um caso de LES controlado e tratado, ou um outro processo auto-imune.

1:160 ou maior - Sugere fortemente um LES apesar de que outras doenças auto-imunes e drogas podem induzir estes títulos altos.

AM

A Cirrose Biliar Primária (CBP) é uma colestase crônica intra-hepática encontrada mais freqüentemente em mulheres que em homens com uma incidência que é maior no grupo de idade de 30-60 anos. O diagnóstico de

CBP é baseado nas observações clínicas, encontros histológicos na biópsia de fígado, atividade de fosfatase alcalina aumentada, níveis elevados de IgM e a presença de anticorpos antimitocôndria²³.

Um resultado positivo é observado quando aparece uma fluorescência granular no citoplasma dos túbulos renais. A fluorescência é limitada ao citoplasma do epitélio tubular distal e proximal. A fluorescência dos outros antígenos celulares tais como um núcleo, músculo liso, ou fluorescência não granular limitada à porção central (lúmen) dos túbulos proximais, deverá ser reportada como AM positivo¹⁴.

Interpretação do Título

O título de ponto final é a diluição mais alta do soro do paciente que apresenta uma fluorescência fraca (+1) do epitélio tubular renal.

Menos que 1:20 - Normal negativo.

1:20 - 1:80 - Positivo. Sugestivo de doença do fígado. Repetir com uma amostra fresca em duas semanas.

1:160 ou maior - Presumível de cirrose biliar primária.

A faixa de título na CBP é de 1:10 a 1:6000 com aproximadamente 50% de pacientes com CBP tendo títulos entre 1:2000 a 1:6000. Os títulos de AM não parecem mudar com o tempo ou terapia e não pode servir como monitor da resposta à terapia.

AML

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

Um resultado positivo é observado como brilhante, coloração citoplasmática difusa das camadas do músculo liso da mucosa muscular encontrada 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 parietais ou tecidos conjuntivos não deverão ser reportadas como AML 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 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 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.

Em alguns casos podem-se assumir algumas formas de gastrites atróficas baseadas somente na ACP. Isto pode não ser relacionada 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 determinados geneticamente (ex. Parentes de pacientes com doenças de 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 não 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 à severidade e duração do estado da doença. Devido a isto não se pode predizer ou assumir o grau de secreção prejudicado do fator intrínseco baseado somente no título de ACP ou a extensão das mudanças histopatológicas”. (Detecção da Imunofluorescência de Doenças auto-imunes. Série Imunológica No. 7, U.S.D.H.E.W. CDC. 1976. p66).

LIMITAÇÕES

ANA

1. Nenhum diagnóstico deverá ser baseado no simples resultado de teste sorológico, uma vez que vários fatores deverão ser tomados em consideração. Estes fatores incluem idade e sexo. Há uma incidência aumentada dos resultados positivos de ANA nos homens e mulheres com o aumento da idade. Mulheres normais entre 20-60 anos têm uma incidência de 7% de ANA. Homens normais têm uma incidência de 3%. Homens e mulheres normais de mais ou menos 80 anos de idade têm uma incidência de 50% de ANA¹⁰.
2. Vários processos auto-imunes induzem testes positivos de ANA.
3. As evidências adicionais para um diagnóstico de LES são fornecidas pelos níveis baixos de complemento, particularmente C1, C3 e C4⁹.
4. Os testes ANA podem não concordar com o “*LE Prep*” ou com testes de látex.
5. A presença de anticorpos para o DNA nativo de dupla hélice é diagnóstico para LES.
6. O acompanhamento da terapia deverá ser baseado não somente nos testes sorológicos primários para LES, mas também na presença de doenças clínicas ativas.
7. Pacientes idosos com LES têm um prognóstico melhor e seus sintomas clínicos diferem substancialmente daqueles observados em pacientes jovens¹¹.
8. Apesar da predominância da classe de anticorpos antinucleares (ANA) ser a imunoglobulina G, a presença de imunoglobulinas E podem ser de importância no LES¹².

AM

1. Nenhum diagnóstico deverá ser baseado em um simples resultado de teste sorológico, uma vez que vários fatores devem ser levados em consideração.
2. As manifestações clínicas, achados histológicos na biópsias, elevações do IgM e valores de fosfatase alcalina aumentadas deverão ser levados em consideração no final do diagnóstico da CBP.
3. Os anticorpos antimicrosossomais do fígado e rim colorem preferencialmente os tubos proximais, enquanto que os AM reagem com os túbulos distais mais fortemente que com os túbulos proximais²².
4. Um IgM normal no soro é uma forte evidência contra o diagnóstico de CBP, quando a concentração aumentada destas imunoglobulinas é anormalmente dominante nestas doenças.
5. O anticorpo antimúsculo liso pode ser detectado em 30-50% e o anticorpo antinuclear em 25-46% dos pacientes com CBP.

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 hepática deverão ser consideradas 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.
5. Os títulos de AML nos mesmos casos de hepatites virais (HVA) podem ser tão altos como nos casos de HCA, entretanto, eles decrescem e desaparecem em um período relativamente curto enquanto que os títulos de HCA permanecem altos por períodos prolongados^{29,30}.
6. O AML representa uma família de anticorpos direcionados contra proteínas presentes nos diferentes tecidos. O padrão glomerular não-homogêneo nunca foi encontrado em pacientes cirróticos. Este padrão está sempre associado com títulos altos de AML em HCA.
7. Em pacientes com HCA que são negativos para HB, os títulos do AML-IgG e ANA-IgA parecem estar relacionados com o grau de atividade inflamatória. Entretanto, nenhum prognóstico importante pode estar associado com este fenômeno³⁶.
8. As drogas que induzem HCA são raras. Entretanto, as drogas oxipenisatina e metildopa têm sido associadas com alguns casos de HCA.
9. Os anticorpos para o DNA nativo de dupla hélice, inicialmente considerado específico para LES, são encontrados em uma variedade de doenças do fígado, incluindo HCA e cirroses.

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 podem dar resultados positivos para ACP.
6. A presença de auto-anticorpos do fator 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 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 controle positivo e negativo, deverá ser ensaiado 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, ou o conjugado ou o antígeno pode estar falhando.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

As características de desempenho do kit de Teste de Pesquisa de auto-imune - Painel 2 foi determinado 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 Pesquisa de auto-imune - PAINEL 2 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.
8. Fritzner MJ and Tan EM: Antibodies to histones in drug induced and idiopathic Lupus Erythematosus. *J Clin Invest* 21:560,1978.
9. Schur PH: Complement in Lupus. In: *Clinics of Rheumatic Diseases*. Philadelphia. WG Saunders,1978.
10. Gladman DD, Urowitz MD and Keystone EC: Serologically active clinically quiescent systemic Lupus Erythematosus. *Am J Med* 66:210-5,1979.
11. Baker SB, Rorura JR, Campion EW and Mills JA: Late onset lupus erythematosus. *Am J Med* 66:727-32,1978.
12. Permin H and Wilik A: The prevalence of IgE antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Acta Pathol Microbiol Scan Ser C* 86:245-9,1978.
13. Nacarato R, Chiarmonte M, Borrelli A and Farini R: Circulating Antibodies in Chronic Liver Disease. *Chron hep Intl Symp*, Montecatini, P Sentilni, H Popper and S Karger, Eds, p. 114-6,1975.
14. Sherlock S and Schever PJ: The presentation and diagnosis of 100 patients with primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 289:647,1973.
15. Doniach D and Walker JG: Progress report mitochondrial antibodies (MA). *Gut*, 15:664-8,1974.
16. Galbraith RM, Smith M et al: High prevalence of sero-immunologic abnormalities in relatives of patients with active chronic hepatitis or primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 290-63-9,1974.
17. Gupta IC, Dickson ER, et al : Circulating IgG complexes in primary biliary cirrhosis, a serial study in forty patients followed for two years. *Clin Exp Immunol* 34:19-27,1978.
18. Ferguson A and MacSween RNM, Eds. *Immunological Aspects of the Liver and Gastrointestinal Tract*, Chapter 10, University Park Press, Baltimore, p. 345-86,1986.
19. Ben-Joseph Y, Shapiro E and Doniach D: Further purification of the mitochondrial inner membrane autoantigen reacting with primary biliary cirrhosis sera. *Immunology* 26:311-21,1974.
20. Gerber MA and Thung SN: Ultrastructural localization of mitochondrial and ribosomal antigens by peroxidase labeled human antibodies. *Labor Invest* 38(2):101,1978.
21. Ladefogel K, Andersen P and Jorgensen J: Autoantibodies and serum immunoglobulin in chronic liver diseases. *Acta Med Scand* 205:104-9,1979.
22. Rizzetto M, Swana G and Doniach D: Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. *Clin. Exp. Immunol* 15:331-44,1973.
23. Skreds S, Blomhoff JP and Gjone E: Biochemical features of acute and chronic hepatitis. *Ann Clin Res* 8:182-99,1976.
24. Ward AM, Ellis G and Goldberg DM: Serum immunoglobulin concentrations and autoantibody titers in diseases of the liver and biliary tree. *am Soc Clin Pathol* 70(3):352-8,1978.
25. Husby G, Skredes S, Bloomhoff JP et al: Serum immunoglobulins and organ non-specific antibodies in diseases of the liver. *Scand J Gastroenterol* 12:297-302,1977.
26. Andersen P, Pedersen TK and Ladefoged K: Studies of smooth muscle antibodies in acute hepatitis. *Acta Pathol Microbiol Scand (C)*84:365-71,1976.
27. Pisi E, Marchesini C, Zaulo D and Bianeki FB: Smooth muscle antibody in chronic hepatitis. *Chron Hep Intl Symp*, P Gentini, H Popper and J Teodori, Eds., Monte-Catini pp 107-13, Karger, Basel,1976.

28. Naccarato R, Chiaramonte M, Borelli A and Farini R: Circulating antibodies in chronic liver diseases. Chron Hep Intl Symp, P Gentini, H Popper and J Teodori, Eds Monte-Catini, pp 114-6. Karger, Basel, 1976.
29. Ishak KC: Light Microscopic morphology of viral hepatitis. Am. J Clin Pathol 65:787-827,1976.
30. Peters RL: Viral hepatitis: A pathologic spectrum. Am J Med Sci 270:17-31,1975.
31. Huang SN, Neurath AR: Immunohistologic demonstration of hepatitis B viral antigens in liver with reference to its significance in liver injury. Lab Invest 40:1-17,1979.
32. Doniach D: Immunofluorescent autoantibody studies in the diagnosis of chronic liver disorders. Rendic Gastroenterol 192-203,1974.
33. Edgington TS and Ritt DJ: Intrahepatic expression of serum hepatitis virus-associated antigens: Immunologic aspects of hepatitis B virus infection. Am J Med Sci 270-213, 1975.
34. Ferguson A and Mac Sween RNM: Autoimmune diseases of the liver. In: Immunological Aspects of Liver and Gastrointestinal Tract. University Park Press, Baltimore, p. 346-86, 1976.
35. Lindman K, Biberfeld G et al : Anti-actin specificity of human smooth muscle antibodies in chronic active hepatitis. Clin Exp Immunol 24:266-72,1976
36. Biberfeld G and Sterner G: Smooth muscle antibodies in mycoplasma pneumoniae infection. Clin Exp Immunol 24:287-91,1976.
37. Andersen P, Small JV and Soliceszek A: Studies on the specificity of smooth muscle antibody. Clin Exp Immunol 26:57-60,1976.
38. Bottazzo GF, Christensen AF et al: Classification of smooth muscle autoantibodies detected by immunofluorescence. J Clin Pathol 29:403-10,1976.
39. Toh BH: Smooth muscle autoantibodies and autoantigens. Clin Exp Immunol 38:621-8,1979.
40. Kurki P, Lindner E, Miettinen A and Alfhan O: Smooth muscle antibodies of actin and non-actin specificity. Clin Immunol Immunopathol 9:443,1978.
41. Stricklan RG and Mackay IR: A reappraisal of the nature and significance of chronic atrophic gastritis. Am J Diag Dis 18:426-40,1973.
42. Glass GBJ: Immunology of atrophic gastritis. NY St J Med 77:1697-1706,1977.
43. Strickland RG and Mackay IR: Op cit.
44. Vandelli, Bottazzo GF, Doniach D and Franchesi F: Autoantibodies to gastrin producing cells in antral (type B) chronic gastritis. N Engl J Med 300(25):1406-10,1979.
45. Coredig R and Toh BH: Reaction of human smooth muscle autoantibody with gastric parietal cells: A pitfall in the diagnosis of parietal cell autoantibody. J Clin Pathol 30:66-70,1977.
46. Glass BGI: Gastric intrinsic factor and other vitamin B12 binders. In: Biochemistry, Physiology, Pathology and Relation to Vitamin B12 Metabolism. Greg Thieme Verlag, Stuttgart,1974.
47. O'Donoghue et al : Gastric lesion in dermatitis herpetiformis. Gut.

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 – Vila Clementino
 São Paulo - SP - CEP 04037-000
 Fone: (011) 3819-5222. Fax: (011) 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 – Vila Clementino

São Paulo - SP - CEP 04037-000

Fone: (0XX11) 3819-5222 Fax: (0XX11) 3816-7623

DATA DA REVISÃO DAS INSTRUÇÕES DE USO

Documento Revisado em: Março de 2014.