



SISTEMA DE TESTE FLUORESCENTE PARA ANA

Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso profissional

USO PRETENDIDO: Este é um teste de anticorpo fluorescente indireto para detecção semiquantitativa de anticorpo antinuclear em soro humano. Este sistema de teste deve ser usado como auxiliar na detecção de anticorpos associados com a doença reumática sistêmica.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Anticorpo antinuclear (ANA) é um termo geral, usado para descrever autoanticorpos para várias proteínas nucleares das células. Estudos iniciais desses anticorpos, que empregaram técnicas de imunofluorescência, revelaram algumas especificidades selecionadas da proteína nuclear (1). Devido à alta correlação do ANA positivo com o lúpus eritematoso sistêmico (LES), o teste negativo para ANA essencialmente excluía a doença (2).

Embora os anticorpos específicos para DNA continuem a mostrar alta correlação com LES (3), várias das macromoléculas nucleares (4) e citoplasmáticas (5-7) também foram detectadas e associadas a outras doenças de tecido conectivo (8-10). Alguns desses anticorpos parecem ter significância diagnóstica e/ou prognóstica na esclerose sistêmica progressiva (11-12), na doença mista do tecido conectivo (13-15), síndrome de Sjögren (16-17), polimiosite (18), e/ou artrite reumatóide (19). Devido a essas associações com a patologia, o teste de ANA é, agora, reconhecido como um instrumento geral de triagem para a doença do tecido conectivo (20).

A sensibilidade do teste de ANA varia com o tipo de substrato usado, com o procedimento de fixação e com os tipos de ANA presentes no soro. Os substratos de cultura celular, via de regra, apresentam maior sensibilidade do que os cortes de tecido (21-24).

O sistema de teste para ANA da Immuno Concepts, com células epitelioides humanas (HEp-2) mitóticas* representa um sistema imunofluorescente avançado para a detecção de ANA. Demonstrou-se que as células HEp-2 com as formas da mitose têm maior sensibilidade e geram um padrão de reconhecimento mais definido do que o clássico substrato de rim de camundongo na detecção de anticorpos na esclerose sistêmica progressiva (ESP) (25). As formas da mitose auxiliam o reconhecimento do padrão diferencial, assim como a detecção de antígenos nucleares não relatados anteriormente, presentes em concentrações mais altas nas células em mitose ativa (26-28).

PRINCÍPIO DO TESTE

O sistema de teste imunofluorescente da Immuno Concepts para ANA usa a técnica indireta de anticorpo fluorescente, descrita pela primeira vez por Weller e Coons (29). As amostras do paciente são incubadas com substrato antigênico para permitir a ligação específica de autoanticorpos ao núcleo das células. Se os ANA estiverem presentes, forma-se um complexo antígeno-anticorpo estável. Depois de lavar para remover os anticorpos ligados de modo não-específico, o substrato é incubado com reagente para anticorpo anti-humano conjugado à fluoresceína.

**Mitose é o termo usado para descrever o processo de divisão celular. Esse processo em geral é dividido em seis fases, quais sejam, interfase, prófase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese.*

Quando os resultados são positivos, ocorre a formação de um complexo estável de três partes, consistindo em anticorpo fluorescente ligado ao anticorpo antinuclear humano, que é ligado ao antígeno nuclear. Esse complexo pode ser visualizado com o auxílio de um microscópio fluorescente. Nas amostras positivas, o núcleo das células apresenta fluorescência verde amarelado com coloração padrão, característica da distribuição peculiar do antígeno nuclear no interior das células. Se a amostra for negativa para ANA, o núcleo não mostrará padrão de clara distinção da fluorescência nuclear.

COMPONENTES DO SISTEMA - MATERIAIS FORNECIDOS

Uso: Todos os componentes vêm prontos para uso, sem necessidade de compor alíquotas ou de reconstituição (exceto para o tampão PBS que deve ser dissolvido em água desionizada ou destilada antes do uso).

Armazenamento: Todos os componentes podem ser armazenados em refrigeração de 2 °C a 10 °C. Depois da reconstituição, o reagente tampão PBS deve ser armazenado em recipientes com tampa de rosca e armazenar de 2 °C a 25 °C.

Estabilidade: Todos os componentes continuam estáveis por pelo menos 12 meses a partir da data de fabricação. Não utilize qualquer componente depois de sua data de validade.

REAGENTES REATIVOS

Lâminas de substrato **SLIDE:** As lâminas de substrato de ANA que usam células HEp-2 (com formas mitóticas) crescem e se estabilizam diretamente nos poços de teste. O modelo único de lâmina com fossos minimiza a contaminação cruzada dos poços durante o teste. A bolsa da lâmina é cheia com um gás inerte não-tóxico que contribui para a estabilidade das células.

Controle positivo homogêneo **CONTROL| +:** N° de Catálogo 2021. Frasco conta-gotas pronto para usar que contém 1,0 ml de soro humano positivo de controle com anticorpo específico para antígenos nucleares de DNA e/ou DNP. Esse soro demonstra uma reação com coloração homogênea no substrato de células HEp-2 da Immuno Concepts. A região do cromossomo de células mitóticas demonstra a mesma reação com coloração homogênea.

Controle positivo marcado **CONTROL| +:** N° de Catálogo 2022. Frasco conta-gotas pronto para usar que contém 1,0 ml de soro humano positivo de controle com anticorpo específico para antígenos nucleares de Sm e/ou RNP. Este soro demonstra uma das mais comuns reações de pontilhado vistas no substrato de células HEp-2 da Immuno Concepts. A região do cromossomo das células mitóticas demonstra reação de coloração negativa.

Controle positivo nucleolar **CONTROL| +:** N° de Catálogo 2023. Frasco conta-gotas pronto para usar que contém 1,0 ml de soro humano positivo de controle com anticorpo específico para antígenos nucleolares. Esse soro demonstra uma reação com coloração nucleolar no substrato de células HEp-2 da Immuno Concepts.

Controle positivo de centrômero **CONTROL| +:** N° de Catálogo 2025. Frasco conta-gotas pronto para usar que contém 1,0 ml de soro humano positivo de controle com anticorpo específico para centrômeros cromossômicos (cinetocore). Este soro demonstra uma reação discreta de coloração pontilhada no substrato de célula HEp-2 da Immuno Concepts. A região do cromossomo das células mitóticas demonstra a mesma reação de coloração pontilhada discreta.

Soro de controle titulável **TC:** N° de Catálogo 2026. Frasco pronto para usar que contém 0,5 ml de soro humano positivo de controle a ser tratado como amostra de paciente não-diluída. Ver o valor da titulação na etiqueta do frasco.

Soro de controle negativo **CONTROL| -:** N° de Catálogo 2031. Frasco pronto para usar que contém 1,0 ml de soro humano negativo de controle. Embora o soro de controle negativo possa demonstrar fluorescência fraca do citoplasma, com coloração mais brilhante da região não-cromossômica da célula mitótica, ele não apresenta padrão discernível de coloração nuclear.

Reagente de anticorpo fluorescente **CONJ|FITC:** N° de Catálogo 2009 (9,0 ml), 2075 (23 ml), 2009CS (9,0 ml), 2075CS (23 ml), 2009B (9,0 ml), 2075B (23 ml). IgG anti-humana conjugada a fluoresceína isotiocianato (FITC). O reagente vem pronto para uso, em frascos conta-gotas de 9,0 ml para cada 10 lâminas no kit completo de teste.

COMPONENTES NÃO-REATIVOS

Tampão PBS em pó **PWDR|PBS**: N° de Catálogo 1011. Solução salina tamponada com fosfato em pó (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada bolsa contém pó de tampão suficiente para fazer 1 litro. (É fornecida uma bolsa de pó de tampão para cada cinco lâminas nos kits completos de teste).

Preparação: Dissolver uma bolsa de pó de tampão em um litro de água desionizada ou destilada, tampar e armazenar entre de 2 °C a 25 °C por até quatro semanas ou até que ocorram sinais de contaminação ou outras alterações visíveis.

Meio de montagem semipermanente **SOLN|MM**: N° de Catálogo 1111. Frasco pronto para usar que contém 5,0 ml de meio de montagem com base em glicerol.

Lamínulas **CVSLP**: N° de Catálogo 1042. Cada pacote contém dez lamínulas de 24 x 64 mm No. 1 de vidro.

Materiais ADICIONAIS NECESSÁRIOS - PORÉM NÃO FORNECIDOS

Pipetas volumétricas para dispensar volumes de 20 a 25 µl
Jarras de Coplin ou placas de coloração
Almotolia ou pipetas Pasteur
Pipetas sorológicas
Recipientes de um litro (para tampão PBS)
Água desionizada e destilada
Tubos de ensaio para preparar diluições de soro
Papel absorvente ou papel-toalha
Câmara para incubação
Luvas descartáveis
Temporizador de laboratório
Microscópio fluorescente equipado com filtro excitador de 495 nm e filtro de barreira de 515 nm

PRECAUÇÕES

1. Todos os materiais de origem humana usados neste produto foram testados e foram negativos (não-reativos repetidamente) para anticorpos para o vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1), vírus da imunodeficiência humana-2 (HIV-2), vírus da hepatite C (HCV) e para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), segundo métodos aprovados pela FDA. Contudo, nenhum método de teste pode oferecer garantia total de que HIV-1, HIV-2, hepatite C, hepatite B ou outros agentes infecciosos estejam ausentes. Assim, todos os materiais do kit devem ser manuseados da mesma maneira que materiais com potencial infeccioso.
2. Todas as amostras de pacientes devem ser manuseadas em nível de Biossegurança 2, conforme as recomendações para amostras de soro ou sangue humano com potencial infeccioso constantes no Manual dos Centers for Disease Control/National Institutes of Health: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. A diluição dos componentes ou a substituição dos componentes além dos fornecidos com o sistema podem gerar resultados inconsistentes.
4. A azida sódica (a 0,09%) é usada como conservante em alguns reagentes. A azida sódica pode reagir com instalações hidráulicas de chumbo ou cobre e formar sais de azida metálica explosivos. Aos (Ao) descartar os reagentes, enxaguar com grandes volumes de água corrente para evitar possíveis resíduos no encanamento. A azida sódica é um veneno e pode ser tóxica quando ingerida.
5. Este kit destina-se ao uso para diagnóstico *in vitro*.
6. Em caso de se utilizar soro hemolisado ou lipêmico, aquecer o soro inativado por 30 minutos até 56 °C para obter resultados ideais. O soro contaminado por micróbios não deve ser usado.
7. O soro de controle titulável destina-se ao uso na monitoração da reprodutibilidade de cada lote e de cada execução. Não se destina como medidor da sensibilidade ou especificidade gerais(al) do ensaio.
8. Não fumar, comer ou beber nas áreas em que as amostras ou reagentes do kit são manuseados.
9. Evitar respingos ou geração de aerossóis todas as(às) vezes.
10. Os tempos e temperaturas de incubação além dos especificados podem gerar resultados errôneos.
11. A contaminação cruzada de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos.
12. A vidraria reutilizável deve ser lavada e totalmente enxaguada, de modo a remover todo o detergente antes do uso. Toda a vidraria deve ser limpa e seca antes do uso.

13. Deixar todos os reagentes, lâminas e amostras chegarem à temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) antes de usar.
14. Usar luvas descartáveis ao manusear amostras e reagentes, e lavar completamente as mãos depois.
15. A contaminação microbiana de reagentes ou amostras pode gerar resultados falsos.
16. Nunca pipetar com a boca e evitar o contato dos reagentes e amostras com a pele e a mucosa. Se ocorrer contato, lavar com sabão germicida e quantidade abundante de água.

COLETA DE AMOSTRA

Coleta: O soro é a amostra preferida. Cerca de 5 ml de sangue total devem ser coletados de modo asséptico, por punção venosa com tubo de coleta estéril e a vácuo ou com outro sistema de coleta adequado. Deixar o sangue coagular em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C). O soro deve ser separado do coágulo por centrifugação, assim que possível para minimizar a hemólise.

Substâncias interferentes: O soro que apresenta alto grau de hemólise, bile, lipemia ou crescimento microbiano não deve ser usado porque essas condições podem ocasionar resultados aberrantes. As amostras que contêm matéria particulada visível devem ser clareadas por centrifugação antes dos testes.

Armazenamento: O soro pode ser armazenado de 2 °C a 10 °C por até uma semana. Se os testes demorarem mais que isso, o soro deve ser armazenado congelado a -20 °C ou menos. O soro não deve ser armazenado em refrigerador ou *freezer* com autodescongelamento.

CUIDADO: O congelamento e descongelamento repetitivo das amostras dos pacientes pode gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

CONTROLE DE QUALIDADE

Controles positivos, negativos e do tampão fosfato salino devem ser testados a cada execução. O controle positivo deve apresentar coloração amarelo esverdeado brilhante no núcleo das células, com um padrão característico claramente distinguível do soro de controle que foi usado. O controle negativo deve mostrar fluorescência verde escuro não-específica de baixa intensidade no citoplasma e no núcleo, mas sem padrão discernível de coloração nuclear. O controle PBS é usado para observar coloração não-específica do reagente de anticorpo, e não deve apresentar fluorescência verde. Se os controles não aparecerem conforme a descrição, o teste é inválido e deve ser repetido.

CONTROLE TITULÁVEL OPCIONAL

Ao ler os títulos, muitos laboratórios começam a leitura no poço que contém a amostra mais diluída e leem "de trás para a frente" até a diluição de 1:40. O primeiro poço no qual o padrão de coloração nuclear claramente discernível é visível é o ponto final de titulação. Recomendamos esta técnica para determinar os pontos finais de titulação.

O título médio e a faixa de título (\pm uma diluição em cada lado da média) determinados foram estabelecidos em nosso laboratório e são fixados como orientação. Esse controle é fornecido, para permitir que cada laboratório avalie a reprodutibilidade (precisão) de seus testes para ANA. Desde que não se pretende que esse controle seja um indicador da exatidão do título, cada laboratório deve estabelecer seu próprio ponto final médio do título para essa amostra, e deve usar essa informação para avaliar reprodutibilidade de cada execução (precisão).

Por meio de múltiplos testes desse controle titulável, usando o Sistema de teste Fluorescente para ANA da Immuno Concepts, estabeleceu-se um valor de título médio para cada número de lote. O número de lote, o título médio e a faixa de título (\pm uma diluição dupla em cada lado da média) são declarados na etiqueta do frasco e devem ser usados como orientação no teste de desempenho do sistema.

É importante que a intensidade da fluorescência não seja confundida com a presença ou ausência de anticorpos antinucleares. O fator principal a considerar na determinação de se uma dada diluição de soro é positiva é o aparecimento de um padrão claramente distinguível, independentemente da intensidade da coloração fluorescente.

Esse controle titulável mostrará o padrão pontilhado típico associado a anticorpo RNP. Também pode estar presente um segundo padrão de NSp I (vários pontilhados discretos nos núcleos das células em interfase), porém, é o padrão pontilhado RNP típico que deve ser usado para os fins de ponto final de leitura.

Os valores obtidos em nosso laboratório podem diferir dos seus valores. Alguns dos muitos fatores que podem afetar seus resultados podem incluir o seguinte, sem a isso se limitar:

1. Tipo de fonte de luz usada. As fontes de luz de mercúrio produzem maior energia de excitação a 495 nm do que o quartzo ou halogênio. As fontes de luz de mercúrio de 50 watt, 100 watt e 200 watt diferem um pouco quanto à energia de excitação a 495 nm. As fontes de luz de quartzo ou halogênio de 100 watt produzem maior energia de excitação a 495 nm que as mesmas fontes de 50 watt.
2. Condição e tempo de uso da fonte de luz. Isso é particularmente verdadeiro para as fontes de luz de mercúrio, que em geral, apresentam redução gradual da energia de excitação a 495 nm antes de queimar. Essa redução gradual da energia de excitação pode resultar em perda significativa de sensibilidade durante várias semanas. Esse problema é evitado mantendo-se um registro de tempo de uso. Para obter melhores resultados, deve-se trocar as lâmpadas de mercúrio de 50 watt depois de 100 horas de uso, e as lâmpadas de mercúrio de 100 ou 200 watt, depois de 200 horas. As fontes de luz de quartzo e halogênio em geral não apresentam redução gradual da energia de excitação antes de queimar.
3. Tipo de filtro excitador usado. Os filtros excitadores de interferência fornecem mais sensibilidade em comprimento de onda muito mais estreito do que os filtros excitadores de absorção. Consultar o manual do microscópio ou o representante de vendas para obter mais informações.
4. Alinhamento adequado da via de luz do microscópio. Consultar as instruções do manual do microscópio fluorescente.
5. Abertura numérica da objetiva. Com a luz fluorescente incidente (Epi), a fluorescência aumenta de maneira exponencial, pois da abertura numérica (NA) da objetiva aumenta ainda mais. Isso pode causar objetiva de 40X, com NA de 0,65 para ler uma ou mais diluições inferiores a objetiva de 40X com NA de 0,85. A abertura numérica está marcada ao lado da objetiva.
6. Filtros de supressão. Os filtros de supressão reduzem os comprimentos de onda específicos de excitação e podem ser usados na redução da sensibilidade. Consultar o manual do microscópio ou o representante de vendas para obter mais informações.
7. Precisão e exatidão da técnica de diluição, do equipamento e do desempenho dos procedimentos do teste.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO PACIENTE

O aumento total de 200X é recomendado para selecionar positivo e negativo, enquanto o aumento total de 400X é recomendado para o reconhecimento do padrão e visualização das células mitóticas.

Negativo: O soro é considerado negativo para anticorpos antinucleares se a coloração nuclear for menor ou igual ao poço de controle negativo, sem padrão claramente distinguível. O citoplasma pode demonstrar coloração fraca, com coloração brilhante da região não-cromossômica das células mitóticas, mas padrão discernível de coloração nuclear.

Positivo: O soro é considerado positivo se o núcleo apresentar padrão claramente distinguível de coloração na maioria das células da interfase.

Títulos: Ao ler os títulos, muitos laboratórios começam a leitura no poço que contém a amostra mais diluída e leem "de trás para a frente" até a diluição de 1:40. O primeiro poço no qual um padrão claramente discernível é visível é o ponto final de titulação. Recomendamos esta técnica para determinar os pontos finais de titulação. É importante que a intensidade da coloração não seja confundida com a presença ou ausência de anticorpos antinucleares. O fator principal a ser considerado ao determinar se uma dada diluição de soro é positiva é o aparecimento de um padrão nuclear claramente distinguível, independentemente da intensidade da coloração.

CUIDADO: Alguns soros podem apresentar coloração nuclear e citoplasmática sem padrão nuclear aparente. Esse fenômeno é, em geral, devido a anticorpos heterófilos e deve ser relatado como um fator negativo (30).

INTENSIDADE FLUORESCENTE

A intensidade fluorescente pode ser semiquantitativa seguindo-se as orientações dos reagentes para anticorpo fluorescente, estabelecidas pelos Centers for Disease Control and Prevention (CDC) dos EUA, em Atlanta, Geórgia.

- 4+ Amarelo esverdeado brilhante (fluorescência máxima): delineamento celular bem-definido; centro celular nitidamente definido.
- 3+ Amarelo esverdeado menos brilhante: delineamento celular bem-definido; centro celular nitidamente definido.
- 2+ Padrão celular definido, mas fluorescência esmaecida: delineamento celular menos bem definido.
- 1+ Fluorescência de muito baixa intensidade: delineamento celular quase indistinguível do centro celular na maioria dos casos.

Existe uma lâmina padrão para a determinação dessas intensidades fluorescentes, FITC QC Slide™, número de catálogo 1900, da Immuno Concepts, N.A. Ltd.

LAUDO DE RESULTADOS

Seleção: Os resultados devem ser relatados como fortemente positivos ou negativos na diluição de 1:40, e o padrão de coloração nuclear deve ser relatado.

Titulação: Os resultados devem ser relatados como a última diluição em série em que a coloração claramente distinguível é observada. Os resultados com uma reação forte na diluição mais alta devem ser relatados como maiores que a diluição. Títulos de 1:40 a 1:80 são considerados baixos; de 1:160 a 1:320 são considerados médios e de 1:640 ou mais são considerados altos. Não é necessário determinar o ponto final do título. Qualquer título de ANA maior ou igual a 1:640 é considerado um título alto e alertará o clínico para fazer testes adicionais. Cada laboratório deve estabelecer seu próprio esquema de titulação, com base nos anticorpos detectados na população de pacientes.

DETECÇÃO DE PADRÃO

Homogêneo: Coloração uniforme do líquido do núcleo com ou sem mascaramento aparente dos nucléolos. A região cromossômica das células mitóticas metafásicas é claramente positiva, com intensidade de coloração suave ou periférica maior ou igual à dos núcleos na interfase.

Sinônimos: Difuso; uniforme.

Antígenos nucleares: dsDNA; nDNA; DNP; histona.

Associação com doenças: Os títulos altos são sugestivos de LES. Os títulos mais baixos são sugestivos de LES ou de outras doenças do tecido conectivo (31).

Periférico: Coloração uniforme, principalmente ao redor da região externa do núcleo, com coloração mais fraca na direção do centro do núcleo. A região cromossômica das células mitóticas metafásicas é claramente positiva, com intensidade de coloração suave ou periférica maior ou igual à dos núcleos na interfase.

Sinônimos: Borda, emaranhado, membranoso.

Antígenos nucleares: dsDNA, ssDNA, nDNA, DNP, histona.

Associação com doenças: Títulos altos sugestivos de LES; títulos baixos, sugestivos de LES ou de outras doenças do tecido conectivo (31).

Pontilhada: A coloração pontilhada grossa ou fina do núcleo, em geral, sem coloração fluorescente dos nucléolos. A região não-cromossômica das células mitóticas metafásicas apresenta coloração, enquanto a região cromossômica é negativa para coloração.

Antígenos nucleares: Sm; RNP; Scl-70; SSA/Ro; SSB/La, e outros sistemas de antígeno/anticorpo ainda não caracterizados.

Associação com doenças: Os títulos altos são sugestivos de LES (antígeno Sm), doença mista do tecido conectivo (antígeno RNP), esclerodermia (antígeno Scl-70) ou síndrome de Sjögren-síndrome seca (antígeno SSA/Ro ou SSB/La). Os títulos baixos podem ser sugestivos de outra doença do tecido conectivo (32).

Nucleolar: Pontilhado grande e grosso no interior do núcleo, em geral, em número inferior a seis por célula, com ou sem pontilhado fino ocasional, mais ou menos na quantidade de 5 a 10. A região não-cromossômica das células mitóticas metafásicas demonstra forte coloração, enquanto a região cromossômica pode apresentar coloração esmaecida. As células em anáfase e telófase podem demonstrar coloração semelhante à dos núcleos interfásicos.

Antígenos nucleares: Em geral, denominados RNA 4-6s e outros antígenos nucleares, como fibrilarina, RNA polimerase I, NOR 90 e PM/Scl.

Associação com doenças: Altos títulos prevalentes na esclerodermia e na síndrome de Sjögren (33).

Centrômero: Pontilhado discreto altamente sugestivo da síndrome CREST[§], variante a esclerose sistêmica progressiva (ESP) (25). O pontilhado nuclear é bastante discreto e, normalmente, é encontrado em múltiplos de 46 (usualmente 23 a 46 pontilhados por núcleo). Como os centrômeros são constrições através das quais as fibras do fuso ligam-se aos cromossomos, as células mitóticas apresentam a mesma reação pontilhada na região cromossômica (12).

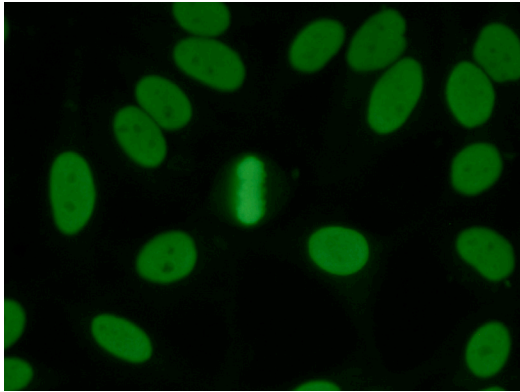
Sinônimos: ACA; pontilhado discreto.

Antígenos nucleares: Centrômero cromossômico (cinetocore).

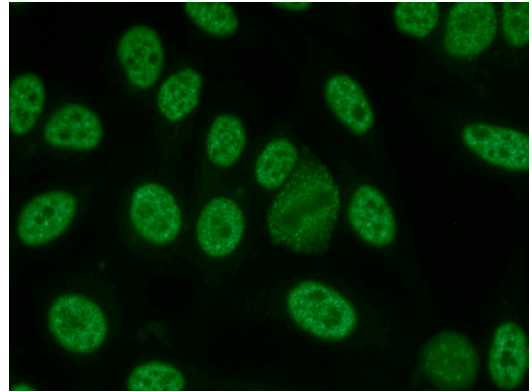
Associação com doenças: Altamente sugestivo de síndrome CREST variante de esclerose sistêmica progressiva (25).

[§]CREST é uma forma de ESP com calcinose proeminente, fenômeno de Raynaud, disfunção esofágica, esclerodactilia e telangiectasia.

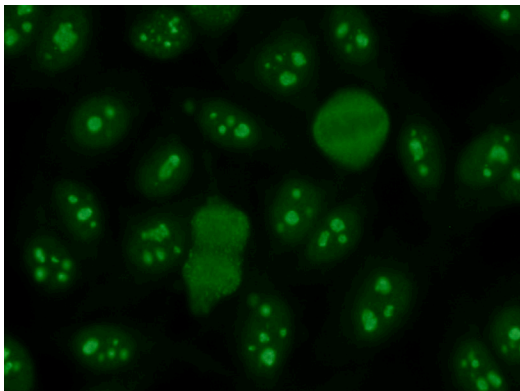
PADRÕES BÁSICOS DE COLORAÇÃO



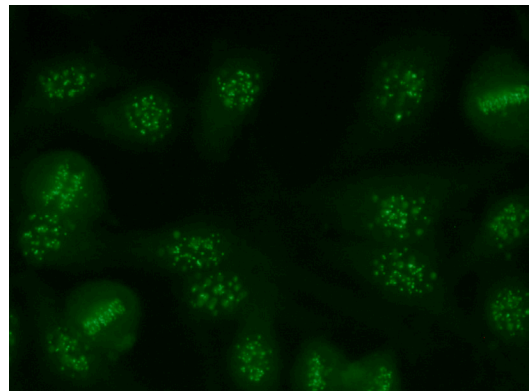
Homogêneo



Pontilhado



Nucleolar



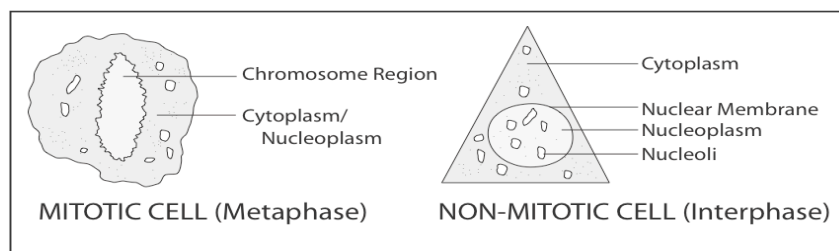
Centrômero

CÉLULAS MITÓTICAS

DETECÇÃO

As células mitóticas devem ser visíveis em cada campo, quando o aumento é 200X ou menor. Para verificar se uma célula está em mitose, o aumento necessário é 400X. As células mitóticas têm forma arredondada característica, sem membrana nuclear detectável. A região cromossômica das células mitóticas em geral apresenta forma irregular no interior da célula, devido à falta de membrana nuclear, e extrema constrição dos cromossomos.

O soro positivo para DNA e/ou DNP e/ou histona (como o controle positivo homogêneo da Immuno Concepts) apresenta coloração brilhante da região cromossômica dessas células. Nas amostras negativas para DNA e/ou DNP e/ou histona (como o controle positivo pontilhado da Immuno Concepts), as células mitóticas não mostram coloração dos cromossomos e podem ser difíceis de visualizar.



USO DE CÉLULAS MITÓTICAS

Discernimento entre anticorpo pontilhado e homogêneo: Às vezes, é difícil distinguir o padrão pontilhado fino da coloração homogênea. Se o padrão for homogêneo, haverá coloração uniforme dos cromossomos das células mitóticas. Se o padrão for de pontilhado grosso, a região externa aos cromossomos mostrará uma reação pontilhada fina.

NOTA: Se ocorrer pontilhado fino em toda a célula mitótica juntamente com a região de coloração uniforme do cromossomo, é bastante provável que dois ou mais anticorpos estejam presentes. Relatar a diluição de seleção como pontilhada/homogênea e titular cada anticorpo até o ponto final.

Anticorpo periférico vs. de membrana nuclear: O anticorpo demonstra um padrão periférico, em geral, é associado a antígenos nucleares DNA/DNP. Os altos títulos desses anticorpos sugerem LES. Nos substratos que não incluem células mitóticas, pode ser difícil distinguir o padrão periférico do anticorpo de membrana nuclear. Utilizando as células mitóticas da Immuno Concepts, esses padrões podem ser diferenciados, porque a região cromossômica das células mitóticas será intensamente corada em padrão periférico, e não será corada pelo anticorpo de membrana nuclear. Essa distinção é clinicamente importante, porque o anticorpo de membrana nuclear não tem especificidade para DNA/DNP e não é associado ao LES (34).

Anticorpo anticentrômero (ACA) vs. centrômero semelhante a anticorpo pontilhado atípico: Para verificar o anticorpo anticentrômero, a região cromossômica das células mitóticas deve ter coloração brilhante com pontilhado discreto. Se a região cromossômica não corar, o anticorpo não tem especificidade para o cinetocore nem associação com a variante CREST da esclerodermia (35). Se a região cromossômica não corar, o anticorpo não é anticentrômero, e deve ser relatado como “pontilhado atípico.”

FLUORESCÊNCIA CITOPLASMÁTICA

Embora os autoanticorpos para antígenos citoplasmáticos não sejam comumente associados à doença do tecido conectivo, esses anticorpos podem ser detectados usando-se substratos de cultura de células epiteliais (36). Os anticorpos mitocondriais e antimúsculo liso são os dois anticorpos detectados com mais frequência e, em geral, associados a mononucleose, hepatite ativa crônica e doença hepática (37-38). Usando o substrato de células HEp-2, também se demonstrou anticorpo antimúsculo em pacientes com verrugas (39).

Anticorpo antimitocondrial (AMA): Pontilhados discretos concentrados na região perinuclear da célula, estendendo-se, em menor intensidade, para as regiões externas do citoplasma. Ele deve ser distinguido do anticorpo anti-Golgi que, via de regra, cora apenas de um lado da região perinuclear, e ao anticorpo antirribossômico, que apresenta pontilhado mais fino com aparência de faixa coerente com a localização do retículo endoplasmático no interior da célula.

NOTA: O pontilhado perinuclear pode ser distinguido com mais facilidade da coloração nuclear periférica ao se observar que o pontilhado mitocondrial forma uma coloração de pontos ininterruptos em torno do exterior da membrana nuclear, enquanto o soro periférico forma uma coloração uniforme e regular no interior da membrana nuclear.

RELATAR O SORO COMO NEGATIVO PARA ANTICORPOS ANTINUCLEARES E VERIFICAR POSITIVIDADE PARA ANTICORPO ANTIMITOCONDRIAL NO SUBSTRATO ESPECÍFICO PARA AMA.

Anticorpo antimúsculo liso (ASMA): Coloração fibrosa muito fina sobre todo o citoplasma das células, com aparência de “teia de aranha”. Diferentemente do anticorpo mitocondrial, o anticorpo antimúsculo liso é uniforme em todo o citoplasma e também pode estender-se sobre o núcleo. As células mitóticas em geral apresentam pontilhado discreto grande no interior da região cromossômica. Foi demonstrado que o anticorpo antimúsculo liso tem alta especificidade para actina (40-41).

RELATAR O SORO COMO NEGATIVO PARA ANTICORPOS ANTINUCLEARES E VERIFICAR POSITIVIDADE PARA ANTICORPO ANTIMÚSCULO LISO NO SUBSTRATO ESPECÍFICO PARA ASMA.

LIMITAÇÕES DO TESTE

1. O diagnóstico pode ser feito com base apenas na detecção de anticorpo antinuclear. O médico precisa interpretar esses resultados em conjunto com a história, os sintomas e os achados físicos e do paciente e com outros procedimentos de diagnóstico.
2. O tratamento não deve ser iniciado com base unicamente em um teste positivo para anticorpos antinucleares. As indicações clínicas, outros achados laboratoriais e a impressão clínica do médico devem ser considerados antes de iniciar qualquer tratamento.
3. Certas medicações, inclusive procainamida e hidralazina, podem induzir doença semelhante ao lúpus eritematoso sistêmico (42). Os pacientes com LE induzido por medicação podem ser positivos para ANAs homogêneos ou ANAs homogêneos/periféricos, comumente direcionados contra histonas nucleares (43).
4. Uma pequena porcentagem de pacientes com LES pode não apresentar ANAs por ensaio imunofluorescente indireto, apresentando-os, porém por outras técnicas (44).
5. Não é necessário determinar o ponto final do título. Qualquer título de ANA maior ou igual a 1: 640 é considerado um título alto e alertará o clínico para fazer testes adicionais. Cada laboratório deve estabelecer seu próprio esquema de titulação, com base nos anticorpos detectados na população de pacientes. Embora o ANA de alto título possa ser bastante sugestivo de doença do tecido conectivo, não se pode considerá-lo diagnóstico, mas sim, visto como parte da história clínica geral de um paciente.
6. Os padrões de coloração com frequência mudam com a titulação progressiva do soro. Esse fenômeno deve-se, geralmente, à presença de mais de um anticorpo nuclear.
7. Como existem muitas opções de microscópios fluorescentes, recomenda-se que as fontes de luz, filtros e a óptica sejam padronizados ao comparar os títulos de pacientes entre laboratórios.
8. Os ANAs positivos também são vistos em uma pequena porcentagem de pacientes com doenças infecciosas e/ou neoplásicas (9).

VALORES ESPERADOS

Em um grande centro médico universitário, foram gerados os seguintes dados, usando-se ANA de substrato de célula HEp-2 durante um período de dois anos (45). Tabela 1.

TABELA 1.

Diagnóstico	Secreção de padrão	% de positivos
População anormal (mais de 4.500 soros testados):		
Lúpus eritematoso sistêmico	Pt, P+H, H, P	93
Artrite reumatoide	Pt, H	40
Doença mista do tecido conectivo	Pt	99
Esclerose progressiva sistêmica-difusa	Pt, N	85
Esclerose progressiva sistêmica-CREST	ACA	93
Artrite reumatoide juvenil		
Sistêmica	Pt	14
Poliarticular	Pt	13
Pauciarticular-B27+	-	0
DM/PM	Pt	25
Vasculite	Pt	20
População normal (mais de 9.000 soros testados):		
20-60 anos	Pt	2
70-80 anos	Pt	3,5

Abreviações: Pt = pontilhado, H = homogêneo, P = periférico, N = nucleolar, ACA = anti-centrômero

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O sistema de teste para ANA da Immuno Concepts foi avaliado em comparação com outros testes fluorescentes para anticorpos já comercializados (45). O estudo empregou 97 amostras de soro de indivíduos normais e de indivíduos com diagnósticos que incluíram lúpus eritematoso sistêmico (LES), doença mista do tecido conectivo (DMTC), variante de CREST para síndrome de Raynaud-esclerose sistêmica progressiva (ESP-CREST), artrite reumatoide (AR), artrite reumatoide juvenil (ARJ), além de outras doenças do tecido conectivo. As amostras de soro foram testadas nas diluições de seleção recomendadas por cada fabricante. Os resultados do estudo estão resumidos na Tabela 2.

TABELA 2.

DIAGNÓSTICO	Número de pacientes	Positivos no Immuno Concepts 1:40	Positivos em células KB 1:20	Positivos em fígado de camundongo 1:20
LES	23	23	22	21
DMTC/sobreposição	7	7	6	4
ESP-CREST Raynaud	17	17	16	7
AR	2	2	2	0
ARJ	4	4	4	3
Outra doença do tecido conectivo	9	9	9	6
Controles hospitalizados	11	7	3	2
Controles normais	24	1	1	0

Os pacientes positivos para as categorias “outra doença do tecido conectivo” no substrato da Immuno Concepts tinham artrite transitória (1), doença indiferenciada do tecido conectivo (1), polimiosite (2), monoartrite (2), poliartrite (3) e afecções sem outra especificação.

Os controles hospitalizados e com substrato da Immuno Concepts positivo para ANAs tinham diabetes (2), artrite sem outra especificação (3), hipotireoidismo (1) e doença renal por imunocomplexo (1) que não satisfizeram os critérios para diagnóstico de LES.

BIBLIOGRAFIA

- Robbins, W.C., Holman, H.R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96:575-579, 1979.
- Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. *California Medicine* 104:463-469, 1966.
- Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 7:379-390, 1964.
- Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: *The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D.* Ed. by H. Busch, pp. 457-477. New York, Academic Press, 1979.
- Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 41:73-80, 1980.
- Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. *J. Immunol.* 123:2673-2681, 1979.
- Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Antiperinuclear Factor. 1. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 38:248-251, 1979.
- Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. *Hum. Pathol.* 9:85-91, 1978.
- Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. *Semin. Arthritis Rheum.* 6:83-124, 1976.
- Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. *J. Invest. Dermatol.* 62:526-534, 1974.
- Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Scl-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *Biol. Chem.* 245:10514 - 10522, 1979.
- Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77:1627-1631, 1980.
- Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
- Sharp, G. C., Irwin, W. S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease-An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52:148-159, 1972.
- Sharp, G. C., Irwin, W. S., May, L. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154, 1976.
- Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1073, 1975.
- Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
- Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
- Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration of Precipitation and Immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* 19:711-719, 1976.
- Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
- Kozin, F., Fowler, M., Koeth, S.M. A Comparison of the Sensitivities and Specificities of Different Substrates for the Fluorescent Antinuclear Antibody Test. *Am. J. Clin. Pathol.* 74:785-790, 1980.
- McCarty, G.A., Rice, J. R. Characterization and Comparison of Available Antinuclear Antibody Kits Using Single Pattern Index Sera. *J. Rheum.* 7:339-347, 1980.
- Hahon, N., Eckert, H. L., Stewart, J. Evaluation of Cellular Substrates for Antinuclear Antibody Determinations. *J. Clin. Microbiol.* 2:42-45, 1975.
- Cleymaet, J. E., Nakamura, R.M. Indirect Immunofluorescent Antinuclear Antibody Tests: Comparison of Sensitivity and Specificity of Different Substrates. *Am. J. Clin. Pathol.* 58:388-393, 1972.

25. Tan, E.M., Rodnan, G. P., Garcia, I., et al. Diversity of Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 23:617-625, 1980.
26. Miyachi, K., Fritzler, M. J., Tan, E.M. Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. *J. Immuno.* 121:2228-2234, 1978.
27. McCarty, G. A., Barada, F. A., Snyderman, R., et al. A New Autoantibody Staining Pattern, the Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics, Clinical Occurrence, and Cytoskeletal Studies. *Arthritis Rheum.* 24:S109, 1981.
28. McCarty, G. A., Valencia, D. W., Fritzler, M. J. Antibody to Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics and Cytological Studies. *J. Rheum.* 11:213-218, 1984.
29. Weller, T.H., Coons, A.H. Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:789-794, 1954.
30. Peter, V.B., Dawkins, R. L. Evaluating Autoimmune Diseases. *Diagnostic Medicine.* Sept. - Oct. 1979.
31. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Int. Med.* 83:464-469, 1975.
32. McDuffie, F. C., Burch, T.N. Immunologic Tests in the Diagnosis of Rheumatic Diseases. *Bull. Rheum. Dis.* 27:900-911, 1976.
33. von Mühlen, C. A., Tan, E. M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. *Sem. in Arthritis and Rheum.* 24:323-358, 1995.
34. Nakamura, R.M., Peebles, C.L., Penn, G.M. Antibodies to Nuclear Antigens (ANA): Atypical Indirect Immunofluorescent Test for Antibodies to Nuclear Antigens (ANA) in a Case of Idiopathic Thrombocytopenia. *Clinical Immunology Check Sample No. C-1-20.* American Society of Clinical Pathologists, 1980.
35. Fritzler, M. J., Valencia, D.W., McCarty, G.A. Speckled Pattern Antinuclear Antibodies Resembling Anticentromere Antibodies. *Arthritis Rheum.* 27:92-96, 1984.
36. Gabbiani, G., Ryan, G.B., Lamelin, J.P., et al. Human Smooth Muscle Antibody. *Am. J. Pathol.* 72:473-488, 1973.
37. Mead, G.M., Cowin, P., Whitehouse, J.M.A. Antitubulin Antibody in Healthy Adults and Patients with Infectious Mononucleosis and its Relationship to Smooth Muscle Antibody (SMA). *Clin. Exp. Immunol.* 39:328-336, 1980.
38. Klatskin, G., Kantor, F.S. Mitochondrial Antibody in Primary Biliary Cirrhosis and Other Diseases. *Ann. Int. Med.* 77:553-541, 1972.
39. McMillan, S.A., Haire, M. Smooth Muscle Antibody in Patients with Warts. *Clin. Exp. Immunol.* 21:339-344, 1975.
40. Anderson, P., Small, J.V., Sobieszek, A. Studies on the Specificity of Smooth Muscle Antibodies. *Clin Exp. Immunol.* 26:57-66, 1976.
41. Lidman, K., Biberfeld, G., Fagraeus, A., et al. Anti-actin Specificity of Human Smooth Muscle Antibodies in Chronic Active Hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 24:266-272, 1976.
42. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. *Arch. Int. Med.* 117:620-626, 1966.
43. Fritzler, M.J., Tan, E.M. Antibodies to Histones in Drug-Induced and Idiopathic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Invest.* 62:560-567, 1978.
44. Gladman, D.D., Chalmers, A., Urowitz, M.B. Systemic Lupus Erythematosus with Negative LE Cells and Antinuclear Factors. *J. Rheum.* 5:142-147, 1978.
45. Dados arquivados por Immuno Concepts.

Em caso de dano na embalagem protetora, entre em contato com a Immuno Concepts antes de usar.



Fabricante



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Limitação de temperatura



Contém o suficiente para <n> testes



Consultar Instruções de uso



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
 Assistência Técnica EUA: 1.800.251.5115 Fora dos EUA: 1.916.363.2649
 Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 2000-I,

4.11.02.003.089-Pt

Rev 5.3 © Copyright 2021

Procedimento de Teste Fluorescente para ANA

NOTA: Se o laboratório está usando um sistema de processamento automatizado de amostras, os procedimentos e recomendações do fabricante do sistema devem ser seguidos. O sistema de processamento de lâminas deve ser programado para diluição apropriada das amostras, dispensação de volumes e tempos de incubação, conforme descrito abaixo.

- 1. RECONSTITUIÇÃO DE TAMPÃO (PBS)**
Dissolver o conteúdo de uma bolsa de tampão em um litro de água desionizada ou destilada. O tampão PBS pode ser tampado e armazenado a 2 °C a 25 °C por até quatro semanas.
- 2. DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DO PACIENTE**
Seleção: Diluir as amostras do paciente até 1:40, adicionando 0,05 ml (50 µl) de soro a 1,95 ml de PBS reconstituído.
Titulação semiquantitativa: Fazer diluições em série de amostra(s) selecionada(s) (por exemplo, 1:80, 1:160, 1:320...etc.), usando PBS.
- 3. PREPARAÇÃO DE LÂMINAS COM SUBSTRATO (20-25 µl/poço)**
Remover a(s) lâmina(s) da bolsa e colocar soro de controle nos poços de controle, da seguinte maneira: Inverter o frasco conta-gotas de controle e comprimi-lo suavemente até que uma gota fique visível na ponta. Deixar a gota tocar suavemente no poço de controle apropriado, evitando o contato direto da ponta do conta-gotas com a superfície da lâmina. Adicionar 1 gota (20-25 µl) da amostra do paciente aos poços numerados.
NOTA: Para a seleção geral, recomenda-se o controle positivo homogêneo. Para a titulação semiquantitativa, selecione o controle positivo que ilustra o padrão mais semelhante de coloração para a amostra selecionada (por exemplo, para a amostra do paciente que gera padrão pontilhado de fluorescência à seleção, usar controle positivo para pontilhado).
CUIDADO: O CONTATO DIRETO DO CONTA-GOTAS COM A SUPERFÍCIE DA LÂMINA PODE RESULTAR EM DANO NO SUBSTRATO DE ANTÍGENO.
- 4. INCUBAR LÂMINAS (30 ± 5 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 25 °C)**
Colocar a(s) lâmina(s) em uma câmara úmida coberta (a placa de Petri com papel-toalha umedecido é adequada). Incubar, com a tampa no lugar, por 30 minutos (± 5 minutos) em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C).
- 5. ENXÁGUE COM PBS**
Remover a(s) lâmina(s) da bandeja de incubação e enxaguar com PBS, usando almotolia, pipetas Pasteur ou pipeta sorológica. Não borrifar o tampão diretamente nos poços.
NOTA: Para evitar a contaminação cruzada nas lâminas, direcione o jato de PBS ao longo da linha média da lâmina, inclinando primeiro a fileira superior dos poços para a frente, e depois, inclinando para a fileira inferior dos poços.
- 6. LAVAGEM COM PBS (10 minutos)**
Lavar a(s) lâmina(s) por 10 minutos com PBS em placa de coloração de lâmina ou jarra de Coplin. Essa lavagem pode estender-se por 10 a 30 minutos, sem ocasionar variabilidade nos resultados finais do teste. Descartar a solução de lavado do PBS depois do uso.
- 7. REAGENTE DE ANTICORPO FLUORESCENTE (Cobrir os poços com 12 a 14 gotas)**
Remover uma lâmina por vez do PBS e mergulhá-la 3 a 5 vezes em água desionizada ou destilada. Bater esse lado da lâmina em papel absorvente ou papel-toalha para remover o excesso de água. Devolver a lâmina imediatamente para a câmara de incubação e cobrir os poços completamente, usando reagente de anticorpo fluorescente; começar colocando uma gota sobre cada poço. Repetir para cada lâmina. O reagente de anticorpo fluorescente foi titulado para compensar o resíduo de água desionizada ou destilada na lâmina depois do enxágue.
NOTA: É importante que os poços de lâminas não sequem durante esse procedimento e que não ocorra dano ao substrato.
NÃO COLOCAR A LÂMINA EM PAPEL ABSORVENTE NEM SECAR DE MANEIRA ALGUMA OU PERMITIR QUE ELA REPOUSE SEM REAGENTE DE ANTICORPO FLUORESCENTE POR MAIS DE 15 SEGUNDOS.
- 8. INCUBAR LÂMINAS (30 ± 5 minutos em temperatura ambiente, isto é, 18 °C a 25 °C)**
Colocar a tampa na câmara de incubação e cobrir com papel-toalha para evitar exposição à luz, se a câmara não for opaca. Deixar a(s) lâmina(s) incubar por 30 minutos (± 5 minutos) em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C).
- 9. ENXÁGUE COM PBS**
Remover a(s) lâmina(s) da bandeja de incubação e enxaguar rapidamente com PBS. Não borrifar o tampão diretamente nos poços.
- 10. LAVAGEM COM PBS (10 minutos)**
Lavar a(s) lâmina(s) por 10 minutos com PBS em placa de coloração de lâmina ou jarra de Coplin. Essa lavagem pode estender-se por 10 a 30 minutos, sem ocasionar variabilidade nos resultados finais do teste, quando não se emprega contracoloração.
Contracoloração opcional: Adicionar 5 a 10 gotas de contracolorante (azul de Evans a 0,5% por 100 ml de PBS) antes da imersão da lâmina. Como o grau de contracoloração desejada varia entre os indivíduos, sua intensidade pode ser aumentada ou diminuída simplesmente ajustando-se o número de gotas adicionadas ao PBS nessa lavagem.
- 11. COLOCAÇÃO DA LAMÍNULA**
Remover uma lâmina por vez do PBS e mergulhá-la 3 a 5 vezes em água desionizada ou destilada (Opcional). Bater esse lado da lâmina em papel absorvente ou papel-toalha para remover o excesso de água. **NÃO COLOCAR A LÂMINA EM PAPEL ABSORVENTE NEM SECAR DE MANEIRA ALGUMA OU PERMITIR QUE ELA REPOUSE SEM LAMÍNULA POR MAIS DE 15 SEGUNDOS.** Adicionar 4 a 5 gotas de meio de montagem semipermanente ao longo da linha média de cada lâmina. Colocar a lamínula cuidadosamente na posição, evitando bolsas de ar, abaixando suavemente a lamínula de uma extremidade da lâmina para a outra.
NOTA: O excesso de meio de montagem na lâmina pode resultar em alta fluorescência de fundo, devido à dispersão da luz ou em falta de boa resolução das células (imagem borrada). O excesso de meio de montagem deve ser removido suavemente colocando-se a lamínula em papel absorvente enquanto se evita qualquer movimento direto.

PARA ASSISTÊNCIA TÉCNICA:

EUA: 1-800-251-5115 Fora dos EUA: 1-916-363-2649
Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

