



SISTEMA DE TESTE HEp-2000[®] FLUORESCENTE ANA-Ro

Para uso diagnóstico in vitro
Para uso profissional

FINALIDADE DO USO: *Esse é um teste de anticorpos por técnica de fluorescência indireta para detecção semiquantitativa de anticorpo antinuclear (ANA) IgG em soro humano por meio de microscopia de fluorescência manual ou com microscópio semiautomático de fluorescência Image Navigator[®]. Este sistema usa células HEp-2 transfectadas[†], que permite uma identificação específica dos auto-anticorpos SSA/Ro. Os auto-anticorpos para SSA/Ro podem apresentar um padrão de coloração distintivo nas células transfectadas. Quando este padrão está presente, ele é considerado uma evidência confirmatória de que os anticorpos anti SSA/Ro estão presentes.*

A ausência deste padrão distintivo não exclui a possibilidade da presença de anticorpos anti SSA/Ro.

Esse sistema de teste deve ser usado como auxiliar na detecção de anticorpos associados a doenças reumáticas sistêmicas em conjunto com outros achados laboratoriais e clínicos. Um operador treinado deve confirmar os resultados gerados com o dispositivo e o software semiautomatizado Image Navigator[®].

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Anticorpo antinuclear (ANA) é um termo geral usado para descrever auto-anticorpos contra várias proteínas nucleares de células. Estudos recentes destes anticorpos, usados em técnicas imunofluorescentes, revelaram um número seletivo de proteínas nucleares específicas (1). Devido à alta correlação entre ANA positivo e lúpus eritematoso sistêmico (SLE), para um ANA negativo é geralmente descartada a suspeita da doença (2).

Apesar dos anticorpos específicos para DNA continuarem a apresentar uma alta correlação com SLE (3), recentemente, um número de macromoléculas nucleares (4) e citoplasmáticas (5-7) têm sido detectadas e associadas com outras doenças de tecido conectivo (8-10). Devido ao fato de alguns desses anticorpos demonstrarem ser de uso para diagnóstico e/ou prognóstico da esclerose sistêmica progressiva (11-12), doença mista do tecido conectivo (13-15), síndrome de Sjögren (16-17), polimiosites (18) e artrite reumatóide (19), o teste de ANA é reconhecido agora como uma ferramenta geral para triagem para doenças de tecido conjuntivo (20).

A sensibilidade do teste ANA varia com o tipo de substrato utilizado, procedimentos de fixação, tipo de ANA presente no soro. Culturas de substratos geralmente mostram maior sensibilidade do que as seções do tecido (21-24). A detecção de anticorpos para SSA (Ro) é especialmente variável. Tecidos de roedores não contém níveis detectáveis de antígeno SSA (Ro) (25), e relatos de detecção de anticorpos anti SSA/Ro em substratos de cultura de células tem uma sensibilidade que varia de 50 a 90% (26-27).

O Sistema de ensaio para ANA-Ro HEp-2000[®] da Immuno Concepts com células epiteliais humanas mitóticas* transfectadas (HEp-2), representa um dos mais avançados sistemas de imunofluorescência para detecção de ANA. As células HEp-2 com fases mitóticas apresentam maior sensibilidade no padrão diferencial do clássico substrato de rim de rato na detecção de anticorpos na esclerose sistêmica progressiva (PPS) (28). As fases mitóticas ajudam no

[†] Células transfectadas e sua aplicação são protegidas por patente americana 5,518,881.

*Mitose é um termo utilizado para descrever o processo de divisão celular. Geralmente é dividido em seis fases incluindo a intérfase, prófase, metáfase, telófase e citocinese.

reconhecimento do padrão diferencial como também na detecção de antígenos nucleares anteriormente não registrados presente em altas concentrações nas células mitoticamente ativas (29-31). As células HEP-2 deste sistema de teste foram transfectadas com múltiplas cópias de seqüência específica de DNA que carregam a informação para os antígenos SSA/Ro. Aproximadamente 10-20% das células transfectadas hiper expressam este antígeno, assim a detecção dos anticorpos para SSA/Ro é mais consistente que nas células que não foram transfectadas. Auto-anticorpos para SSA/Ro podem apresentar um padrão distinto de coloração nas células transfectadas. Quando este padrão estiver presente, é uma evidência confirmatória de que anticorpos anti SSA/Ro estão presentes.

A ausência deste padrão distintivo não exclui a possibilidade da presença de anticorpos anti SSA/Ro.

PRINCIPIO DO TESTE

O teste ANA fluorescente da IC usa uma técnica de fluorescência indireta para anticorpos descrita inicialmente por Weller e Coons (32). Amostras de pacientes são incubadas com substrato antígeno que permite uma ligação específica com dos autoanticorpos com o núcleo da célula. Se ANAs estiverem presentes, um complexo estável antígeno-anticorpo é formado. Após lavagem para remover os anticorpos não-específicos, o substrato é incubado com anticorpos anti-humanos conjugados com fluoresceína. Quando os resultados forem positivos, há formação de um complexo estável de três fases, que consistindo na ligação anticorpo fluorescente com o anticorpo antinuclear humano, o qual está ligado ao antígeno nuclear. Este complexo pode ser visualizado com a ajuda de um microscópio fluorescente. Em amostras positivas, os núcleos das células terão fluorescência cor verde-maçã com um padrão de coloração característico da distribuição particular do antígeno nuclear dentro das células. Se a amostra para ANA for negativo, os núcleos não apresentarão um padrão claramente distinguível de fluorescência.

COMPONENTES DO SISTEMA- MATERIAIS FORNECIDOS

Uso: Todos os componentes estão prontos para uso, não precisando, assim, alíquotar ou reconstituir (exceto a Solução Tampão de lavagem PBS, que deve ser dissolvida em água deionizada ou destilada antes de seu uso).

Armazenamento: Todos os componentes devem ser armazenados sob refrigeração entre 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 permanecem estáveis, tanto no kit fechado como após abri-lo, por pelo menos 12 meses a partir da data de fabricação. Não use nenhum componente após a data de validade.

REAGENTES REATIVOS

Laminas Substrato **SLIDE:** Laminas com substrato ANA usando células HEP-2000[®] (com formas mitóticas) cultivadas e estabilizadas diretamente nos poços de teste Estas são células foram transfectadas com auto antígeno SSA/Ro. Lâmina exclusiva, projetada para minimizar a contaminação cruzada dos poços durante o teste. Estas lâminas estão embaladas com um gás inerte e atóxico que ajuda a manter a estabilidade das células. Lâminas estão disponíveis com 7 poços, 13 poços, 14 poços, 18 poços ou 21 poços, dependendo das necessidades do laboratório.

Controle Positivo SSA/Ro **CONTROL|+:** Catalogo No. 2035-Ro. Frasco conta-gotas pronto para uso contendo 1,0 mL de soro de controle humano positivo com anticorpo IgG específico para antígenos SSA/Ro. Este soro apresenta uma reação de coloração pontilhado fino que é típica de anti SSA/Ro visto no substrato celular HEP-2000[®] Immuno Concepts. A expressão é predominantemente na região nuclear com evidente coloração nucleolar. Coloração fraca do citoplasma também podem ser vistos nas células super expressadas. A região cromossômica das células mitóticas demonstram uma reação de coloração negativa.

Controle Positivo Homogêneo **CONTROL|+:** Catalogo No. 2021. Frasco conta-gotas pronto para uso contendo 1,0 mL de soro de controle humano positivo com anticorpo IgG específico para DNA e/ou antígenos nucleares DNP. Este soro demonstra uma reação de coloração homogênea no substrato celular HEP-2000[®] Immuno Concepts . A região cromossômica das células mitóticas demonstram a mesma reação de coloração homogênea.

Controle Positivo Pontilhado **CONTROL|+:** Catalogo No. 2022. Frasco conta-gotas pronto para uso contendo 1,0 mL de soro de controle humano positivo com anticorpo IgG específico para Sm e/ou antígenos nucleares RNP. Este soro demonstra reação de uma das mais comuns coloração pontilhado vistos no substrato celular HEP-2000[®] Immuno Concepts. A região cromossômica das células mitóticas demonstram uma reação de coloração negativa.

Controle Positivo Nucleolar **CONTROL|+:** Catalogo No. 2023. Frasco conta-gotas pronto para uso contendo 1,0 mL de soro de controle humano positivo com anticorpo IgG específico para antígenos nucleolares. Este soro demonstra uma reação de coloração nucleolar no substrato celular HEP-2000[®] Immuno Concepts.

Controle Positivo Centromérico [CONTROL|+]: Catálogo No. 2025. Frasco conta-gotas pronto para uso contendo 1,0 mL de soro de controle humano positivo com anticorpo IgG específico para centrômeros cromossômicos (cinetócoros). Este soro demonstra uma discreta reação de coloração pontilhada no substrato celular HEp-2000® Immuno Concepts. A região cromossômica das células mitóticas demonstram uma discreta reação pontilhada.

Soro Controle Titulável [TC]: Catálogo No. 2026. Frasco pronto para uso contendo 0,5 mL de soro humano de controle positivo com anticorpos IgG para serem tratados como uma amostra não diluída do paciente.

Soro Controle Negativo [CONTROL|-]: Catálogo No. 2031. Frasco conta-gotas pronto para uso, contendo 1.0 mL de soro controle humano. Embora este soro controle negativo possa demonstrar uma fraca reação citoplasmática com coloração mais brilhante na região não cromossômica das células mitóticas, não há uma coloração nuclear de padrão discernível.

Reagente Anticorpo Fluorescente [CONJ|FITC]: Catálogo No. 2009-Ro (9,0 mL), 2075-Ro (23 mL). Soro anti humano IgG de cabra (cadeias pesada e leve) conjugado com o isotiocianato de fluoresceína (FITC). Reagente pronto para uso em frascos conta gota de precisão com 9,0 mL para cada 10 lâminas fornecidas no kit completo. Para usuários que preferem um reagente de anticorpo fluorescente específico de IgG, N° de Catálogo 2009CS (9,0 mL), 2009G-Ro (9,0 mL), 2009GCS-Ro (9,0 mL), 2075CS (23mL), 2075G-Ro (23mL) e 2075GCS-Ro (23mL) estão disponíveis. Entre em contato com seu representante da Immuno Concepts para obter informações sobre pedidos.

COMPONENTES NÃO REATIVOS

Tampão PBS em pó [PWDR|PBS]: Catálogo No. 1011. Tampão fosfato salino em pó (0,01 M, pH7,4±0,2). Cada envelope contém tampão em pó suficiente para preparar um litro (Um envelope de tampão em pó é fornecida para cada 5 lâminas em kit completo).

Preparação: Dissolver um envelope de tampão em pó em um litro de água deionizada ou destilada, tampar e armazenar entre de 2 °C a 25 °C por até 4 semanas ou até sinais de contaminação ou se outra mudança visível ocorrer.

Meio para Montagem semi-permanente [SOLN|MM]: Catálogo N°. 1111. Frasco conta-gotas contendo 5,0 mL de meio para montagem a base de glicerol, pH 9,1±0,2.

Lâminulas [CVSLP]: Catálogo No. 1042. Cada pacote contém dez lâminulas de vidro 24 x 64 mm Lâminulas No. 1

MATERIAIS ADICIONAIS NECESSÁRIOS – MAS NÃO FORNECIDOS

Pipetas de precisão volumétrica para dispensar volumes de 20-25µl

Jarras Coplin ou cubas de lavagem

Pissetas ou pipetas Pasteur

Pipetas sorológicas

1 frasco de 1 litro (para o tampão PBS)

Água destilada ou deionizada

Tubos de teste para preparar diluições de soro

Lenço de papel ou papel toalha

Luvas de látex descartáveis

relógio

Microscópio Fluorescente equipado com filtro de excitação 495 nm e filtro de barreira 515 nm

PRECAUÇÕES

1. Todos os materiais de procedência humana utilizados neste produto foram testados e considerados negativos (não reativo repetidamente) para anticorpos contra o vírus - 1 da Imunodeficiência humana (HIV – 1), vírus - 2 da Imunodeficiência humana (HIV – 2), vírus da hepatite C (HCV), e de antígeno de superfície da hepatite B (HbsAg) pelos métodos aprovados pelo FDA. Porém, nenhum método de teste pode oferecer completa segurança para o HIV-1, HIV-2, hepatite C, hepatite B ou outros agentes infecciosos estão ausentes. Assim, todos materiais do kit devem ser manipulados da mesma maneira como materiais potencialmente infectantes.
2. Todas as amostras do paciente devem ser manipuladas com Biossegurança de Nível 2 como recomendado para qualquer soro humano potencialmente infectante ou amostras de sangue conforme o Disease Control/Nacional Institutes of Health Manual: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Edição 1999*.
3. A diluição dos componentes ou substituição de outros componentes que são fornecidos neste sistema pode causar resultados incompatíveis.

4. A azida sódica (0.1%) é utilizada como um conservante no soro controle. A azida sódica pode reagir com cobre ou chumbo do encanamento e formar azidas de metal altamente explosiva.
5. Ao descartar os reagentes, lave com amplo volume de água para prevenir resíduos potenciais no encanamento. A azida sódica é um veneno e pode ser tóxico se ingerida.
6. Este kit é para ser utilizado em diagnóstico in vitro
7. No caso de soro hemolizado ou lipêmico tiver de ser utilizado, inativar por 30 minutos à 56°C para otimizar os resultados. Soro contaminado microbiologicamente não será deverá ser utilizado.
8. O soro controle titulável é indicado para uso em monitoramento da reprodutibilidade lote a lote e corrida a corrida. Não é indicado como um quantificador de sensibilidade ou especificidade do ensaio
9. Não fume, coma ou beba nas áreas onde as amostras ou os reagentes do kit são manipulados.
10. Evite espirros e geração de aerossóis.
11. O tempo e temperatura da incubação diferente do especificado podem gerar resultados errôneos.
12. Contaminação cruzada de reagentes ou amostras podem dar resultados falsos.
13. Artigos de vidro reutilizáveis devem ser lavados e enxaguados completamente sem detergentes antes do uso. Todos os artigos de vidro devem estar limpos e secos antes do uso.
14. Deixe todos os reagentes, substrato e amostras atingir a temperatura ambiente (18-25 °C) antes do uso.
15. Utilize luvas de látex descartáveis ao manipular as amostras e os reagentes e depois lave bem as mãos.
16. Contaminação microbiana dos reagentes podem resultar em resultados falsos.
17. Nunca pipete com a boca e evite contato dos reagentes e amostras com a pele e mucosas. Se ocorrer o contato, lavar a região afetada com sabão e grande quantidade de água.

COLETA DE AMOSTRA

Coleta: O soro é a amostra preferida. Aproximadamente 5 mL do sangue total devem ser coletados assepticamente pela punção venosa usando um tubo de coleta a vácuo ou outro sistema de coleta adequado. Deixar o sangue coagular em temperatura ambiente (18-25 °C). O soro deve ser separado do coágulo pela centrifugação o mais rápido possível para evitar hemólise.

Interferentes: O soro com um alto grau de hemólise, icterícia, lipemia ou crescimento microbiano não deve ser utilizado devido estas condições poderem causar falsos resultados. Amostras contendo partículas visíveis devem ser centrifugados antes do teste.

Armazenagem: Os soros podem ser armazenados entre 2-10 °C por até uma semana. Se os testes demorarem mais do que este prazo, congelar os soros à -20 °C ou mais baixo. Os soros não devem ser armazenados em congeladores de auto descongelamento.

Cuidados: Repetidos congelamentos/descongelamentos de amostras de pacientes podem gerar resultados de falso positivo ou falso negativo.

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 uma fluorescência verde-maçã brilhante no núcleo das células, com padrão característico claramente discernível do soro controle que for utilizado. O controle negativo apresenta fraca e não específica fluorescência verde no citoplasma e núcleo, mas com padrão não discernível de coloração nuclear. O controle PBS é usado para observar padrões não específicos do anticorpo do reagente, e não deve apresentar fluorescência. Se os controles não estiverem como as características descritas, o teste é invalidado e deve ser repetido. Os cinco controles padrão devem ser executados pelo menos uma vez a cada lote de kits para demonstrar a aparência esperada dos padrões de ANA. Se o Teste Hep-2000® para ANA for ser usado para confirmação da presença de anticorpos anti SSA/Ro o Controle Positivo SSA/Ro, catálogo número 2035-Ro, deve ser testado pelo menos em uma lâmina na corrida do dia.

CONTROLE TITULÁVEL OPCIONAL

Quando lendo a titulação, a maioria dos laboratórios começam lendo pelos poços de maior diluição e lêem na ordem contrária, para a diluição de 1:40. O primeiro poço em que é visto mais claramente a fluorescência é o ponto de parada da titulação. Nós recomendamos essa técnica para determinação dos pontos de parada da titulação. A média e faixa de titulação (média ± uma diluição) foram determinados em nosso laboratório e é declarado como um guia. Este controle é fornecido para permitir que cada laboratório alcance a reprodutibilidade (precisão) neste teste de ANA. Desde que não se pretenda que este controle seja um indicador de precisão de titulação, cada laboratório deve estabelecer sua própria média de ponto de parada da titulação para esta amostra, e deve utilizar essa informação para alcançar reprodutibilidade de corrida a corrida.

Através de vários testes desse controle de titulação, usando o Sistema de Teste de Fluorescência para ANA da Immuno Concepts, um valor médio de titulação será estabelecido para cada número de lote. O número do lote, a média e faixa do título são estabelecidos no rótulo do frasco e deve ser usado como um guia para a performance do teste.

É importante que a intensidade de fluorescência não seja confundida com a presença ou ausência de anticorpos antinucleares. O fator chave a ser considerado, para determinar se uma dada diluição é positiva, é o aparecimento de um padrão claramente discernível, indiferentemente da intensidade de coloração fluorescente.

Este controle titulável apresentará um padrão pontilhado típico associado com o anticorpo RNP. Também pode estar presente um segundo padrão de MND I (várias pontos discretos no núcleo de células em interfase), porém, é padrão RNP típico de pontilhado que é utilizado com o propósito de ler o ponto de parada.

Os valores obtidos em nosso laboratório podem ser diferentes dos seus valores. Alguns de vários fatores podem afetar seus resultados, podendo incluir, mas não somente a eles, os seguintes:

1. O tipo de fonte utilizada. As fontes de mercúrio irão produzir uma maior energia de excitação a 495 nm que a de Quartzo/Hidrogênio. Lâmpadas de 50 watts, 100 watts e 200 watts de fonte de mercúrio diferenciam-se pouco na energia de excitação a 495 nm. Lâmpada de 100 watts de fonte de Quartzo/Hidrogênio produzirá uma energia de excitação a 495 nm maior que as de 50 watts de fonte de Quartzo/Hidrogênio.
2. As condição e idade das fontes de luz. Esta é verdade particularmente para a fonte de luz de Mercúrio, a qual, em geral, exibe primeiramente uma redução gradual na energia de excitação a 495 nm e depois queima. Essa redução gradual na energia de excitação pode resultar em uma perda significativa na sensibilidade com o decorrer de várias semanas. Este problema pode ser evitado através de um registro de tempo. Para melhores resultados, trocar a lâmpada 50 watts de mercúrio, perto de 100 horas de uso, pelas de 100 watts ou 200 watts, pós 200 horas de uso.
3. O tipo de filtro utilizado. Interferências nos filtros de excitação garantem maior sensibilidade sobre um comprimento de onda bem estreito que os filtros de absorção de excitação. Procure o manual de seu microscópio fluorescente ou seu representante de venda para maiores informações.
4. Alinhamento apropriado da trajetória da luz do microscópio. Procure o manual de seu microscópio fluorescente ou seu representante de venda para maiores informações.
5. O angulo de abertura da objetiva. Com a incidência de luz fluorescente (Epi), a fluorescência é aumentada exponencialmente, assim como o angulo de aberta (NA) da objetiva aumenta a conjuntiva. Isso pode causar uma objetiva de 40x com NA de 0,65 ler uma ou mais diluições abaixo que a objetiva de 40x com NA de 0.85. O angulo de abertura está escrito no lado da objetiva.
6. Filtros de supressão. Filtros de supressão reduzem comprimentos de onda específicos de excitação e podem ser usados na redução da sensibilidade. Procure o manual de seu microscópio fluorescente ou seu representante de venda para maiores informações.
7. Precisão e exatidão da técnica de diluição, equipamentos e performance destes procedimentos.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Aumento total de 200x é recomendado para testes de triagem, enquanto o aumento total de 400x é recomendado para reconhecimento do padrão e visualização das células mitóticas.

Negativo: Um soro é considerado negativo para anticorpos antinucleares se a fluorescência do núcleo for menor ou igual ao controle negativo. O citoplasma pode apresentar fraca coloração, com coloração brilhante da região não cromossômica das células mitóticas, mas sem padrão nuclear claramente discernível.

Positivo: Um soro é considerado positivo se o núcleo apresentar um padrão claramente discernível de coloração na maioria das células na interfase.

SSA/Ro: Um soro é considerado positivo para anticorpos SSA/Ro se 10-20% dos núcleos interfásicos apresentarem um padrão de fluorescência distintivo SSA/Ro, que aparece como um padrão distintivo pontilhado com proeminente coloração no nucléolo. Estes são as células transfectadas hiper expressadas. Os demais 80-90% de núcleos interfásicos podem ou não demonstrar uma reação de coloração pontilhado com ou sem coloração do nucléolo.

Titulação: Ao ler a titulação, a maioria dos laboratórios começam lendo pelos poços de maior diluição e lêem na ordem contrária, para a diluição de 1:40. O primeiro poço em que o padrão é claramente discernível é o ponto de parada da titulação. Nós recomendamos esta técnica para determinação de ponto de parada dos títulos. É importante que a intensidade de fluorescência não seja confundida com a presença ou ausência de anticorpos antinucleares. O fator chave a ser considerado, para determinar se uma dada diluição é positiva, é o aparecimento de um padrão claramente discernível, indiferentemente da intensidade de coloração. Devido ao aumento da concentração de antígeno SSA/Ro nas células hiper expressadas, não é incomum ver coloração de células em altos títulos. O significado clínico destes altos títulos são desconhecidos.

CUIDADOS: Alguns soros podem demonstrar coloração nuclear e citoplasmática sem padrão nuclear aparente. Este fenômeno geralmente é devido à anticorpos heterófilos e devem ser relatados como negativo (33).

INTENSIDADE DE FLUORESCENCIA

A intensidade de fluorescência pode ser semiquantificada, seguindo-se diretrizes para os Reagentes de Anticorpo Fluorescente, estabelecidos pela CDC (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia).

- 4+ Verde-amarelado brilhante (Fluorescência máxima): Contorno bem definido, centro da célula nitidamente definido
- 3+ Verde-amarelado menos brilhante: Contorno bem definido, centro da célula nitidamente definido
- 2+ Padrão celular definido, mas com pouca fluorescência: Contorno pouco definido
- 1+ Fluorescência reduzida: Contorno da célula quase indistinguível do centro da célula na maioria dos casos

Uma lâmina padronizada para determinação de intensidade de fluorescência, FITC QC Slide™, catálogo 1900, está disponível na Immuno Concepts, N.A. Ltd.

RELATANDO OS RESULTADOS

Exame: Os resultados devem ser relatados como positivo ou negativo na diluição 1:40 e o padrão de coloração nuclear deve ser relatado para amostras positivas.

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 PADRÕES

Homogêneo: Uma coloração sólida dos núcleos com ou sem aparência visível do nucléolo. A região cromossômica das células mitóticas em metáfase é claramente positiva com uma intensidade de coloração periférico ou lisa, igual ou superior ao núcleo em intérfase.

Sinônimos: Difuso; sólido

Antígenos nucleares: dsDNA; nDNA; DNP; histona.

Associação com doenças: Altos títulos são sugestivos de SLE. Títulos baixos são sugestivos de SLE ou outras doenças do tecido conectivo (34).

Periférico: Uma coloração sólida, principalmente ao redor da região externa dos núcleos, com coloração mais fraca em direção ao centro dos núcleos. A região cromossômica das células mitóticas em metáfase é claramente positiva com uma coloração periférico lisa ou periférica, de intensidade maior ou igual, ao núcleo em intérfase.

Sinônimos: borda, membrana

Antígenos nucleares: dsDNA; ssDNA; nDNA; histona.

Associação com doenças: Altos títulos são sugestivos de SLE. Títulos baixos são sugestivos de SLE ou outras doenças do tecido conjuntivo (34).

Pontilhado: Uma coloração granular ou grossa dos núcleos geralmente sem coloração no nucléolo. A região não cromossômica das células mitóticas em metáfase demonstram coloração, quando a região cromossômica é negativa para o corante.

Antígenos nucleares: Sm; RNP; Scl-70; SSB e outros sistemas antígeno/anticorpo não caracterizados.

Associação com doenças: Altos títulos são sugestivos de SLE (antígeno Sm), doença mista do tecido conectivo (antígeno RNP), escleroderma (antígeno Scl-70), ou Síndrome de Sjögren (antígeno SSA ou SSB). Títulos baixos são sugestivos de outras doenças do tecido conjuntivo (35).

Nucleolar: Coloração pontilhado grande e grosso dentro do núcleo geralmente em número inferior a 6 por célula, com ou sem pontilhado fino ocasional. A região não cromossômica das células mitóticas em metáfase demonstram forte coloração. Células em anáfase e em telófase podem demonstrar coloração similar dos núcleos em intérfase.

Antígenos nucleolares: Geralmente referente ao RNAs 4-6s e outros antígenos nucleares como a fibrilarina, RNA Polimerase I, NOR 90 e PM/Scl.

Associação com doenças: Prevalência de altos títulos na escleroderma e na Síndrome de Sjögren (36).

Centromérico: Um discreto padrão pontilhado altamente sugestivo da síndrome de CREST[§] variante da esclerose sistêmica progressiva (28). Os pontilhados no núcleo são muito discretos e normalmente múltiplos de 46 (normalmente 23-46 pontos por núcleo) pois os centrômeros são constrições onde fibras difusas ligam-se aos cromossomos. Células mitóticas apresentarão a mesma reação pontilhado na região cromossômica (12).

[§] CREST é uma forma de PSS com proeminente Calcinose, fenômeno de Raynaud, disfunção esofágica, esclerodactilia e teleangectasia.

Sinônimos: ACA; pontilhado discreto (12).

Antígenos nucleares: Centrômero cromossomal (cinetocore).

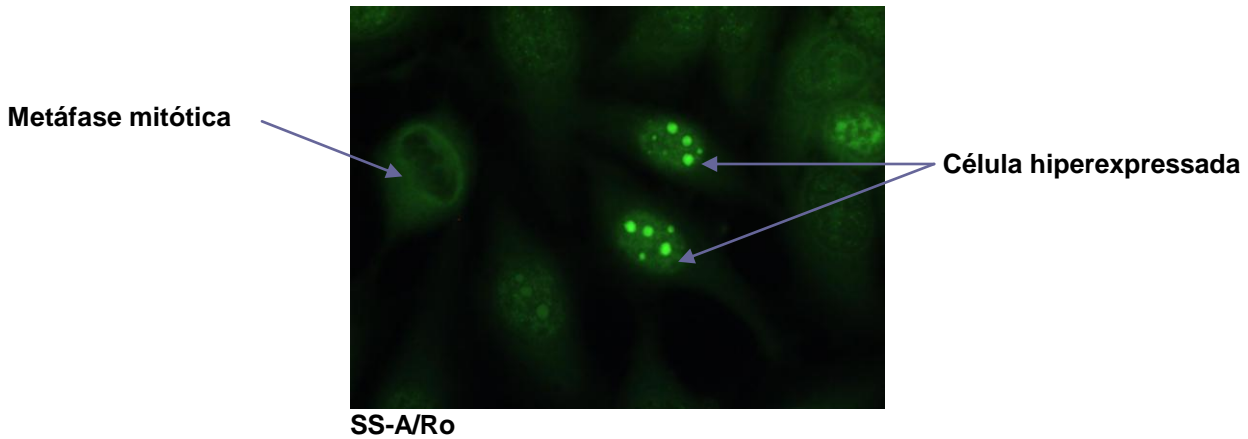
Associação com doenças: Altamente sugestiva de síndrome de CREST variante da esclerose sistêmica progressiva (28).

SS-A/Ro: Um padrão distintivo pontilhado com coloração proeminente do nucléolo em 10-20% dos núcleos interfásicos. Estes são as células transfectadas hiper expressadas.

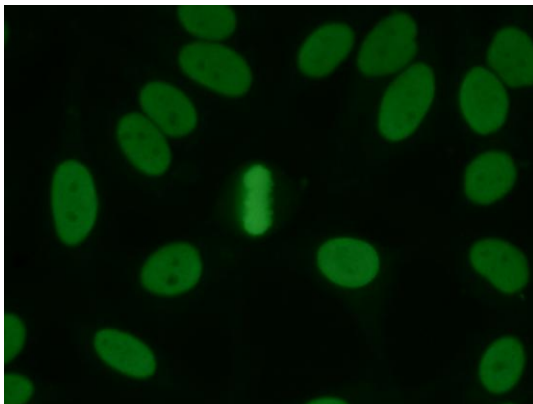
Os demais 80-90% de núcleos interfásicos podem ou não demonstrar reação de coloração pontilhada fino dos núcleos com ou sem coloração do nucléolo. A região não cromossômica das células em metáfase apresentam coloração, enquanto a região cromossômica é negativa.

Antígenos nucleares: SS-A/Ro (60kD).

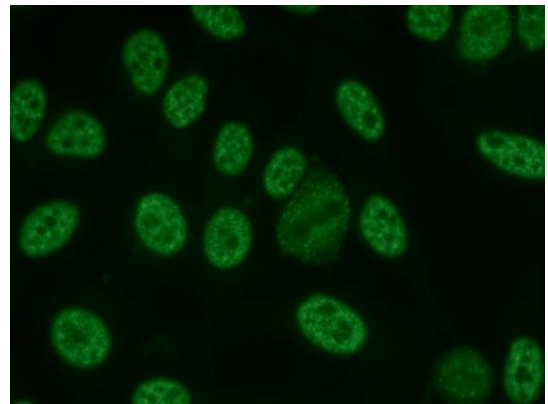
Associação com doenças: Visto em 60-70% dos pacientes com Síndrome de Sjögren primária, 30-40% em pacientes com SLE, e em mais de 95% dos pacientes com lúpus cutâneo subagudo.(37)



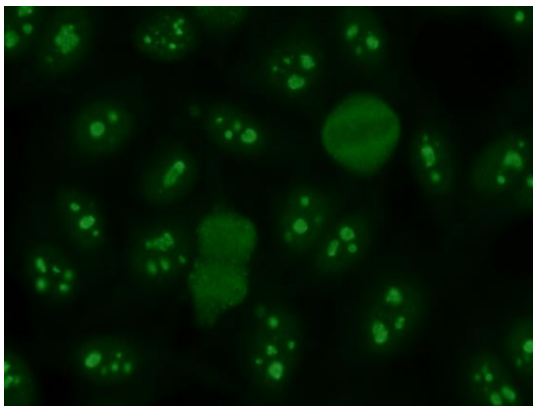
PADRÕES BÁSICOS DE COLORAÇÃO



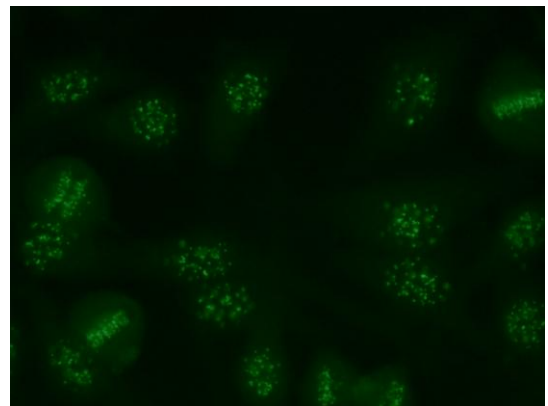
Homogeneo



Pontilhado



Nucleolar



Centromerico

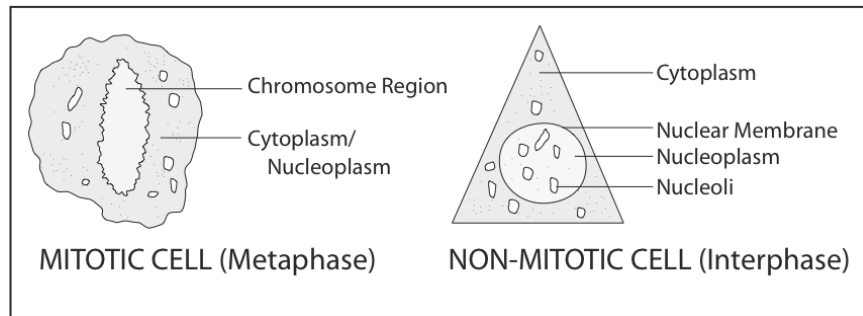
CÉLULAS MITÓTICAS

DETECÇÃO

As células devem ser visíveis em todo o campo quando observada com aumento de 200x ou mais. Para verificar se uma célula está em mitose, observe em um aumento de 400x. As células mitóticas exibem uma característica em forma redonda sem membrana nuclear detectável.

A região cromossômica das células mitóticas geralmente apresentam uma forma irregular dentro da célula, devia a 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) apresentarão coloração da região cromossômica destas células. Nas amostras negativas para DNA e/ou DNP e/ou histona (como o controle positivo pontilhado IC) as células mitóticas não apresentarão coloração cromossômica e pode ser de difícil visualização.



USO DAS CÉLULAS MITÓTICAS

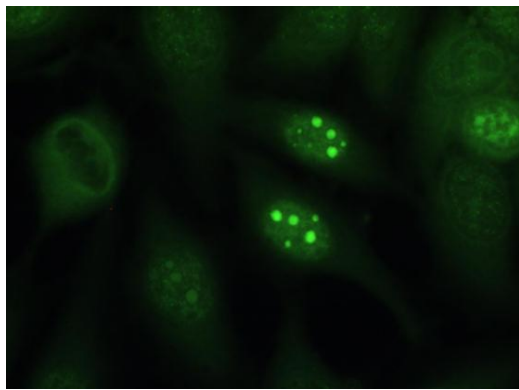
Diferenciando anticorpos Pontilhado vs. Homogêneo: Um padrão de coloração pontilhado fino às vezes dificulta a diferenciação da coloração homogênea. Se o padrão é homogêneo haverá coloração sólida do cromossomo das células mitóticas. Se o padrão é estritamente pontilhado, a região externa dos cromossomos apresentarão uma reação de pontilhado fino.

NOTA: Se uma fina coloração pontilhada na célula mitótica ocorrer junto da coloração sólida da região cromossômica, é altamente provável que dois ou mais anticorpos estão presentes. Registre a diluição de triagem como padrão misto homogêneo/pontilhado e titule cada um dos anticorpos.

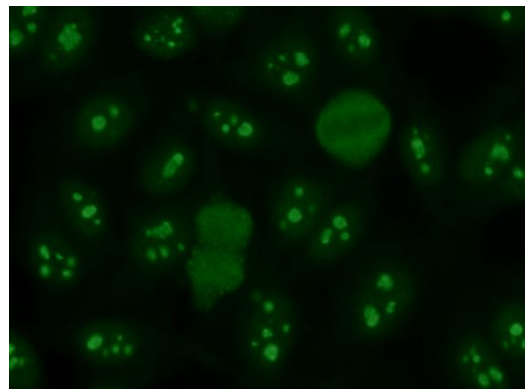
Anticorpo Membrana Nuclear vs. Periférica: O anticorpo que apresenta um padrão periférico está geralmente associados com antígenos nucleares DNA/DNP. Altos títulos destes anticorpos são sugestivos de SLE. Em substratos que não incluem células mitóticas, o padrão periférico pode ser de difícil distinção em relação ao anticorpo de membrana nuclear, estes padrões podem ser diferenciados, pois a região cromossômica das células mitóticas serão intensamente coradas no padrão periférico, mas não serão coradas pelo anticorpo de membrana nuclear. Esta distinção é clinicamente importante pois o anticorpo de membrana nuclear não tem especificidade do DNA/DNP e não está associado com SLE (38).

Anticorpo Anti-Centrômero (ACA) vs. Pontilhado atípico semelhante ao centromérico: A fim de verificar o anticorpo anti centrômero, a região cromossômica das células mitóticas devem corar com brilho e discreto pontilhado. Se a região cromossômica não estiver corada o anticorpo não é anti centrômero e deve ser relatado como "pontilhado atípico" (39).

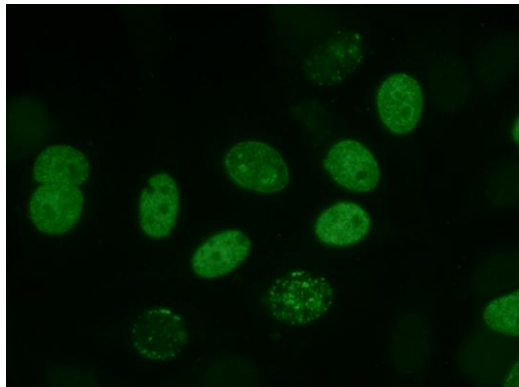
SSA/Ro vs. Padrões que podem assemelhar-se a coloração SSA/Ro: A coloração distinta de SSA/Ro é visto como um padrão distinto pontilhado brilhante com coloração proeminente do nucléolo em 10-20% dos núcleos interfásicos. Os demais 80-90% de núcleos interfásicos podem ou não podem demonstrar coloração pontilhada dos núcleos com ou sem coloração de nucléolo. A região não cromossômica das células em metáfase não apresentam coloração. O padrão nucleolar pode ser diferenciado pela coloração grossa e pontilhada em todo o núcleo, geralmente menor que 6 por célula. O padrão Scl-70 apresenta coloração pontilhado e coloração nucleolar em todos os núcleos em interfase e coloração da região cromossômica em células em metáfase. Anticorpos para Antígeno Nuclear em Células em Proliferação, (PCNA) apresenta um pontilhado de fino para grosso em 30-50% dos núcleos interfásicos.



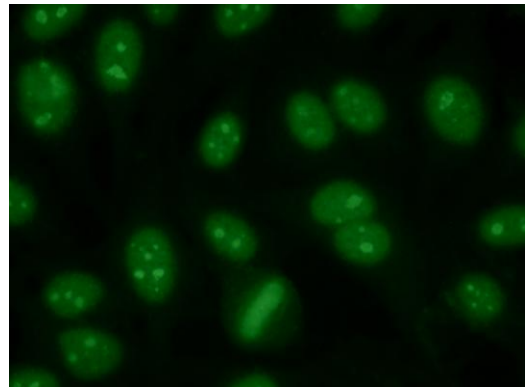
SS-A/Ro



Nucleolar



PCNA



Scl-70

FLUORESCENCIA CITOPLASMÁTICA

Embora os autoanticorpos para antígenos citoplasmáticos não serem comumente associados com doenças do tecido conectivo, estes anticorpos podem ser detectados utilizando substrato de cultura celular epitelial (40). Anticorpos do músculo liso e mitocondrial são os dois anticorpos mais comumente detectados e estão geralmente associados com mononucleose, hepatite crônica ativa, doenças do fígado (41-42). Utilizando o substrato celular HEp-2, anticorpos músculo liso também foram observados em pacientes com verrugas (43).

Anticorpo Anti-Mitocondrial (AMA): Pontilhados discretos concentrados na região perinuclear da célula e se estendendo em menor densidade para regiões externas do citoplasma. Este padrão pode ser diferenciado do padrão anticorpo anti-Golgi, que geralmente cora somente um lado da região perinuclear e do anticorpo anti-ribossomal, que apresenta um padrão pontilhado fino de aspecto filamentososo compatível com a localização do retículo endoplasmático dentro da célula (50).

NOTA: Pontilhados perinucleares podem ser facilmente distinguidos da coloração nuclear periférica observando que o padrão mitocondrial forma um pontilhado ininterrupto ao redor do exterior da membrana nuclear, enquanto o padrão periférico forma uma coloração suave sólida dentro da membrana nuclear.

RELATAR COMO SENDO SORO NEGATIVO PARA ANTICORPOS ANTI NUCLEARES E VERIFICAR A POSITIVIDADE PARA ANTICORPOS ANTI MITOCONDRIA EM SUBSTRATO AMA ESPECÍFICO.

Anticorpo do Músculo Anti-Liso (ASMA): Coloração de fibras muito finas sobre todo o citoplasma da célula com uma aparência de “teia de aranha”. Diferente do anticorpo mitocondrial, a coloração de anticorpos de músculo liso é uniforme sobre todo o citoplasma e pode também se estender sobre o núcleo. Células mitóticas geralmente apresentam grandes pontos discretos fora da região cromossômica (50). Anticorpos de músculo liso tem apresentado uma alta especificidade para a actina. (44-45).

RELATAR COMO SENDO SORO NEGATIVO PARA ANTICORPOS ANTI NUCLEARES E VERIFICAR A POSITIVIDADE PARA ANTICORPOS ANTI MUSCULO LISO EM SUBSTRATO ASMA ESPECÍFICO.

LIMITAÇÕES DO TESTE

1. O diagnóstico não pode ser feito com base somente na detecção de anticorpos antinuclear. O médico deve avaliar o resultado juntamente com a história e sintomas do paciente, os achados físicos e outros procedimentos de diagnóstico.

2. O tratamento não deve ser iniciado com base num teste positivo para anticorpos antinuclear. Sinais clínicos, outros achados laboratoriais e impressões clínicas físicas devem ser considerados antes de iniciar qualquer tratamento.
3. Algumas drogas, incluindo procainamida e hidralazina, podem induzir a uma doença semelhante a lúpus eritematoso (46). Paciente com LE induzido por drogas pode demonstrar um padrão homogêneo positivo ou homogêneo/periférico, ANAs comumente direcionados contra histona nuclear (47).
4. Uma pequena porcentagem de pacientes com SLE podem não demonstrar ANAs através do teste de imunofluorescência indireta mas pode apresentar ANAs através de outras técnicas (48).
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 altos títulos ANA possam ser altamente sugestivos de doença do tecido conectivo, este não deve ser considerado como diagnóstico, mas ser visto como uma parte da história clínica geral do paciente.
6. A coloração dos Padrões de fluorescência podem mudar com a titulação progressiva do soro. Este fenômeno é geralmente devido a presença de mais do que um anticorpo nuclear.
7. Devido às várias opções disponíveis para microscópio fluorescentes, é recomendado que a fonte de luz, filtros e lentes sejam padronizadas para quando comparar titulações de pacientes de laboratórios diferente.
8. ANAs positivos são também encontrados em pequena porcentagem dos pacientes com infecções e/ou doenças neoplásicas (9).
9. Os autoanticorpos para SSA/Ro apresentam um padrão de coloração distintivo em células transfectadas. Quando este padrão estiver presente é considerada uma evidência confirmatória que os anticorpos antiSSA/Ro estão presente. A ausência deste padrão distintivo não exclui a possibilidade de anticorpos anti-SSA/Ro estarem presentes.
10. Devido a hiper expressão de autoantígeno SSA/Ro nas células HEp-2000®, as amostras que contém anticorpos anti SSA/Ro apresentam valores mais altos de titulação nas células que os valores obtidos nas células HEp-2 não transfectadas. Já que nenhum dos outros anticorpos nas células HEp-2000® são afetados pelo processo de transfecção Soros com outros autoanticorpos específicos não demonstram diferença de titulação significativa entre a linha de células de HEp-2000® transfectadas e as células HEp-2 não transfectadas

VALORES ESPERADOS

Em um grande centro médico universitário , utilizando substrato ANA de células HEp-2, os seguintes dados foram gerados ao longo de um período de dois anos (49). Tabela 1.

TABELA 1

Diagnóstico	Padrão de identificação	% Positivo
População anormal (mais de 4,500 Soros Testados):		
Lúpus eritematoso sistêmico	S, P+H, H, P	93
Artrite reumatóide	S, H	40
Doença mista do tecido conjuntivo	S	99
Esclerose sistêmica progressiva-difusa	S, N	85
Esclerose sistêmica progressiva-CREST	ACA	93
Artrite reumatóide juvenil		
Sistêmica	S	14
Poliarticular	S	13
Pauciarticular-B27+	-	0
DM/PM	S	25
Vasculites	S	20
População normal (mais de 9,000 Soros testados):		
20-60 anos	S	2
70-80 anos	S	3,5

Abreviações: S=pontilhado, H=Homogeneo, P=Periférico, N=Nucleolar, ACA=anti-Centrômero

INTERVALO DE REFERÊNCIA

O intervalo de referência para detecção de anticorpos antinucleares na população normal é "Negativo". Como mostrado na tabela acima, uma pequena porcentagem de indivíduos normais apresentará ANA positivos. Cada laboratório deve estabelecer e manter seus próprios valores de intervalo de referência (normal), com base na população de pacientes e outros fatores locais.

CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE

AMOSTRAS NORMAIS

Amostras de soro de 500 doadores de sangue, 258 homens e 242 mulheres, nenhum deles tendo qualquer história conhecida de doenças reumáticas e foram testadas usando células não transfectadas HEp-2 em paralelo ao Teste HEp-2000® Fluorescente ANA-Ro. Nesta população, 36 amostras (7,2%) apresentaram testes positivos para anticorpos antinucleares à diluição de 1:40 de soro. Os padrões de coloração foram idênticos nos dois substratos para 34 das 36 amostras positivas. As duas amostras que apresentaram diferenças foram ambas de pacientes mulheres, e em ambas foi confirmada a presença de anticorpos anti SSA/Ro. Uma destas amostras apresentou fraca reação padrão pontilhado nas células HEp-2 não transfectadas e uma típica coloração SSA/Ro no Teste HEp-2000® Fluorescente ANA-Ro. A outra amostra era negativa nas células HEp-2 não transfectadas, mas apresentou típica coloração SSA/Ro no Teste HEp-2000® Fluorescente ANA-Ro. A especificidade destas duas amostras foi confirmada por teste ELISA e por Western Immunoblotting. As amostras que foram negativas nos testes de ANA foram também negativas no teste ELISA.

SOROS DE PACIENTES COM SÓMENTE ANTICORPOS SSA/Ro

Amostras de soro de 46 pacientes com SLE ou Síndrome de Sjögren foram testadas usando um kit comercialmente disponível, com células HEp-2 não transfectadas e o Teste HEp-2000® fluorescente ANA-Ro. Em todas amostras foram confirmadas a presença de anticorpos para SSA/Ro por teste ELISA e Western Immunoblotting. Nenhum outro anticorpo foi detectado em qualquer uma destas amostras. Trinta e seis destas amostras (78%) foram positivas (padrão pontilhado) com as células HEp-2 não transfectadas. E todas as 46 (100%) foram positivas (padrão de coloração distintivo de SSA/Ro com o Teste HEp-2000® fluorescente ANA-Ro

SORO DE PACIENTES COM ANTICORPOS DIFERENTES DE SSA/Ro

Amostras obtidas de 230 pacientes com varias doenças reumáticas e não reumáticas foram testadas usando um teste comercialmente disponível com células HEp-2 não transfectadas em paralelo com o Teste HEp-2000® fluorescente ANA-Ro. Um único padrão de coloração foi encontrado em 120 amostras, e padrões mistos foram encontrados em 110 amostras.

Dentre da população total de 230 amostras, 333 padrões foram idênticos nos dois substratos. Vinte e nove amostras apresentaram padrão de coloração distintivo de SSA/Ro no Teste HEp-2000® fluorescente ANA-Ro. Vinte e três destas amostras apresentaram padrão pontilhado nas células HEp-2 não transfectadas. As seis amostras discrepantes (positivas no Teste HEp-2000® ANA-Ro e negativas para as células HEp-2 não transfectadas) tinham anticorpos para SSA/Ro como demonstrado pelo padrão de coloração distintivo de SSA/Ro, pelo teste ELISA e Western blot.

COMPARAÇÃO DE TÍTULO

Devido à hiper expressão de antígenos SSA/Ro em células HEp-2000®, as amostras que contém anticorpos anti SSA/Ro apresentam valores mais altos de titulação nas células que os valores obtidos nas células não transfectadas HEp-2. Já que nenhum dos outros anticorpos nas células HEp-2000® são afetados pelo processo de transfecção, soros com outros autoanticorpos específicos não demonstram diferença de titulação significante entre a linha de células de HEp-2000® transfectadas e células HEp-2 não transfectadas.

REPRODUTIBILIDADE DE TITULAÇÃO

Dez amostras, escolhidas do CDC e outro soro bem caracterizado internamente, foram corridos em três diferentes números de lotes em lâminas HEp-2000®, em três ocasiões diferentes. Em nenhum caso, uma amostra negativa deu resultados positivos. Todos os valores de titulação estavam dentro do valor médio de titulação estabelecido para as amostras avaliadas.

CONFIRMAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI SSA/Ro

Em um grande laboratório de referência de reumatologia, amostras de soros de 349 pacientes com ANAs positivos conhecidos foram testados usando o Teste HEp-2000® Fluorescente ANA-Ro. Nesta população selecionada, 239 amostras apresentaram um padrão de coloração distintivo SSA/Ro). Testes ELISA positivos para anticorpos anti SSA/Ro foram obtidos em 238 (99,6%) das 239 amostras. E ainda 79 amostras apresentaram forte padrão pontilhado e/ou homogêneo, e deram teste ELISA positivo para anticorpos anti SSA/Ro. Com isso, o padrão distinto de SSA (Ro) é considerado uma evidência confirmatória de que os anticorpos anti SSA/Ro estão presentes, mas a ausência deste padrão distintivo não exclui a possibilidade de anticorpos anti SSA/Ro estarem presentes. Em estudos descritos acima, examinamos um total de 429 soros que continham anticorpos anti SSA/Ro confirmados com teste ELISA ou Western Immunoblots, e que apresentaram padrão de coloração SSA/Ro distintivo nas células transfectadas HEp-2000®.

Também vimos amostras que continha anticorpos anti SSA/Ro, mas não apresentavam padrão de coloração SSA/Ro distintivo, devido ao alto nível de outros anticorpos (geralmente anti-DNA ou anti-Sm/RNP) que mascaravam o padrão SSA/Ro. Com isso, se o padrão de coloração SSA/Ro distintivo for encontrado, é confirmada a presença dos anticorpos anti SSA/Ro mas a ausência deste padrão distintivo não exclui a possibilidade de anticorpos anti SSA/Ro.

USE COM O IMAGE NAVIGATOR®

O Image Navigator® é o sistema semiautomatizado da Immuno Concepts para leituras de lâminas de ANA fluorescentes HEp-2000®. Em uma comparação do Image Navigator® com leitura convencional de lâminas de ANA fluorescentes, os dados a seguir foram obtidos:

Acordo positivo, 99,8%; acordo negativo, 98,9%; acordo geral, 99,4% (n = 739 amostras).

A sensibilidade clínica para detecção de ANA em pacientes conhecidos por terem lúpus eritematoso sistêmico foi de 93,8% para leitura convencional e 94,1% para o Image Navigator®. Em 301 pacientes com doenças do tecido conjuntivo conhecidas, a sensibilidade clínica foi de 82,7% para leitura convencional e 83,1% para o Image Navigator®.

Em um grupo de 296 pacientes com doenças que não sejam de tecido conjuntivo e 142 participante saudáveis de controle (total n = 438), a especificidade clínica demonstrou ser 87,3% para leitura convencional e 87,4% para o Image Navigator®.

LITERATURA

1. 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.
2. Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. *California Medicine* 104:463-469, 1966.
3. Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 7:379-390, 1964.
4. 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.
5. Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 41:73-80, 1980.
6. 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.
7. 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.
8. Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. *Hum. Pathol.* 9:85-91, 1978.
9. Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. *Semin. Arthritis Rheum.* 6:83-124, 1976.
10. Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. *J. Invest. Dermatol.* 62:526-534, 1974.
11. Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *Biol. Chem.* 245:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzier, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77:1627-1631, 1980.
13. Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
14. 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.
15. 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.
16. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1073, 1975.
17. 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.
18. Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Hahon, N., Eckert, H. L., Stewart, J. Evaluation of Cellular Substrates for Antinuclear Antibody Determinations. *J. Clin. Microbiol.* 2:42-45, 1975.
24. 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. Harmon C.E., Deng J.S., Peebles C.L., Tan E.M.: The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. *Arthritis Rheum.* 27:166-173, 1984.
26. Maddison P.J., Provost T.T., Reichlin M.: Serological findings in patients with "ANA negative" systemic lupus erythematosus. *Medicine* 60:87-94, 1981.
27. Itoh Y., Rader M.D., Reichlin M.: Heterogeneity of the Ro/SS-A antigen and autoanti-Ro/SSA response: evidence of the four antigenically distinct forms. *Clin. Exp. Immunol.* 81:45-51, 1990.
28. Tan, E.M., Rodnan, G. P., Garcia, I., et al. Diversity of Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 23:617-625, 1980.
29. Miyachi, K., Fritzier, M. J., Tan, E.M. Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. *J. Immuno.* 121:2228-2234, 1978.
30. 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.
31. McCarty, G. A., Valencia, D. W., Fritzier, M. J. Antibody to Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics and Cytological Studies. *J. Rheum.* 11:213-218, 1984.
32. 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.
33. Peter, V.B., Dawkins, R. L. Evaluating Autoimmune Disease. *Diagnostic Medicine.* Sept. - Oct. 1979.
34. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Int. Med.* 83:464-469, 1975.
35. McDuffie, F. C., Burch, T.N. Immunologic Tests in the Diagnosis of Rheumatic Diseases. *Bull. Rheum. Dis.* 27:900-911, 1976.
36. Ritchie, R.F. Antinuclear Antibodies. Their Frequency and Diagnostic Application. *N.Engl. J. Med.* 282:1174-1178, 1970.
37. Chan, E. K. L., Andrade, L. E. C. Antinuclear Antibodies in Sjögren's Syndrome. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 18:551-570, 1992.
38. 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.

39. Fritzler, M. J., Valencia, D.W., McCarty, G.A. Speckled Pattern Antinuclear Antibodies Resembling Anticentromere Antibodies. *Arthritis Rheum.* 27:92-96, 1984.
 40. Gabbiani, G., Ryan, G.B., Lamelin, J.P., et al. Human Smooth Muscle Antibody. *Am. J. Pathol.* 72:473-488, 1973.
 41. 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.
 42. Klatskin, G., Kantor, F.S. Mitochondrial Antibody in Primary Biliary Cirrhosis and Other Diseases. *Ann. Int. Med.* 77:553-541, 1972.
 43. McMillan, S.A., Haire, M. Smooth Muscle Antibody in Patients with Warts. *Clin. Exp. Immunol.* 21:339-344, 1975.
 44. Anderson, P., Small, J.V., Sobieszek, A. Studies on the Specificity of Smooth Muscle Antibodies. *Clin Exp. Immunol.* 26:57-66, 1976.
 45. 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.
 46. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. *Arch. Int. Med* 117:620-626, 1966.
 47. Fritzler, M.J., Tan, E.M. Antibodies to Histones in Drug-Induced and Idiopathic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Invest.* 62:560-567, 1978.
 48. Gladman, D.D., Chalmers, A., Urowitz, M.B. Systemic Lupus Erythematosus with Negative LE Cells and Antinuclear Factors. *J. Rheum.* 5:142-147, 1978.
 49. Data on file. Duke University Medical Center, Durham, North Carolina.
 50. McCarty, G.A., Valencia, D.W., Fritzler, M. J. Antinuclear Antibodies: Contemporary Techniques and Clinical Application to Connective Tissue Diseases. New York, Oxford University Press, 1984.

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



Prescrição (Rx) apenas - apenas para prescrição médica

Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
 Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
 Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 2000-Ro-I,

4.11.02.003.091-Pt

Rev 4.3 © Copyright 2020

PROCEDIMENTO DE TESTE HEP-2000® ANA-Ro FLUORESCENTE

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 DO TAMPÃO (PBS)

Dissolver o conteúdo de um envelope em um litro de água destilada. O tampão PBS pode ser armazenado em 2-25 °C por até 4 semanas.

2. DILUIR AMOSTRA DO PACIENTE

Triagem: Diluir a amostra do paciente numa proporção de 1:40 através da adição de 0,05 mL (50µL) de soro a 1,95 mL (1950µL) de PBS reconstituído. *

Titulação semi quantitativa: Para fazer uma série de diluições à razão 2 (isto é, 1:80, 1:160, 1:320, ...etc.), utilizando PBS.

3. PREPARO DAS LAMINAS DE SUBSTRATO (20-25 µl/poço)

Retire lamina(s) do(s) envelope(s) e coloque o soro ou controles como se segue: Inverter o frasco conta-gotas até que a gota seja visível. Cuidadosamente, toque a gota do controle apropriado no poço evitando que a ponta do conta gotas toque na superfície da lamina. Em seguida adicione 1 gota (20-25 µl) da amostra do paciente diluído nos poços demarcados.

NOTA: Para triagem geral, o controle positivo homogêneo é recomendado. Para titulação semiquantitativa, o controle titulável, número de catálogo 2026, devem ser executadas com cada lote de amostras dos pacientes. Todos os controles padrão devem ser executados com cada número de lote de kits para demonstrar a aparência esperada dos padrões de ANA. Se o teste for realizado para confirmação da presença de anticorpos anti SSA(Ro), utilize o controle cód. 2035-Ro em pelo menos uma lâmina.

CUIDADO: CONTATO DIRETO DA PONTA DO CONTA-GOTAS COM A SUPERFÍCIE DA LÂMINA PODE RESULTAR EM DANOS COM O SUBSTRATO ANTIGENICO.

4. INCUBAÇÃO DAS LAMINAS (30±5 minutos a temperatura ambiente – 18 a 25 °C)

Coloque a(s) lâmina(s) em uma câmara úmida coberta (uma placa de Petri com papel toalha molhado já será adequado). Incube, em local fechado, por trinta minutos (±5 minutos) à temperatura ambiente (18-25 °C).

5. ENXAGUE COM PBS

Remova a(s) lâmina(s) da incubadora e lave brevemente com PBS usando uma piseta ou Pipeta Pasteur. Não dispense o tampão diretamente nos poços.

6. LAVAGEM COM PBS (10 minutos)

Lavar a lamina(s) durante 10 minutos com PBS em uma cuba de lavagem ou jarra Coplin. O tempo pode ser aumentado até 30 minutos sem variação no resultado final. Descarte o PBS após o uso.

7. REAGENTE ANTICORPO FLUORESCENTE (Cubra os poços com 12-14 gotas)

Remova uma lâmina de cada vez do tampão e mergulhe de 3-5 vezes na água destilada ou deionizada. Batê-los de lado contra papéis absorventes para remover o excesso de água. Retorne imediatamente a lâmina à câmara de incubação e cubra os poços completamente usando o Reagente de Anticorpo Fluorescente. Repita o procedimento para cada lâmina. O Reagente de Anticorpo Fluorescente foi titulado para compensar a água que tiver permanecido na lâmina depois do enxágüe.

NOTA: é importante que o poço da lâmina não seque durante este procedimento ou danos ao substrato poderão ocorrer. NÃO SEQUE A LÂMINA OU PERMITA QUE ESTA PERMANEÇA SEM REAGENTE DE ANTICORPO FLUORESCENTE POR MAIS DE 15 SEGUNDOS.

8. INCUBAR AS LAMINAS (30 ± 5 minutos em temperatura ambiente i.e. 18-25 °C)

Coloque a lamina na câmara úmida e cubra com papel para prevenir exposição direta à luz se a câmara não for opaca. Incubar a(s)

lamina(s) em temperatura ambiente (18-25 °C) por 30 minutos (± 5 minutos).

9. RINSAR COM PBS

Remova a(s) lamina(s) da cuba e rince rapidamente com PBS. Não direcione o jato diretamente sobre os poços.

10. LAVAGEM COM PBS (10 minutos)

Lavar a(s) lamina(s) com PBS durante 10 minutos em cuba de lavagem ou jarra Coplin. Esta lavagem pode ser estendida até 30 minutos sem alteração no resultado final quando não é utilizado contra-coloração.

Contra-coloração opcional: Adicionar de 5-10 gotas de corante (0,5% de Azul de Evans) por 100 mL de PBS antes a imersão da(s) lâmina(s). Conforme ao grau de coloração desejada pode-se aumentar ou diminuir a contra coloração pelo simples ajuste de número de gotas adicionadas ao PBS nesta lavagem.

11. MONTAGEM COM LAMÍNULA

Remova uma lâmina de cada vez do tampão e mergulhe de 3-5 vezes na água destilada ou deionizada (Opcional). Batê-los de lado contra papéis absorventes para remover o excesso de água.

NÃO SEQUE A LÂMINA OU PERMITA QUE ESTA PERMANEÇA SEM LAMÍNULA POR MAIS DE 15 SEGUNDOS.

Adicionar 4-5 gotas de Meio de Montagem Semi-permanente ao longo da linha média de cada lâmina. Coloque cuidadosamente a lamínula na posição, evitando bolhas de ar, através do abaixamento da lamínula de uma extremidade da lâmina para outra.

NOTA: Excesso de Meio de Montagem pode gerar um alto background fluorescente, devido à dispersão da luz, ou a falta de resolução das células (imagem borrada). Excesso de Meio para Montagem pode ser removido da lâmina através da secagem suave da lamínula com papel absorvente evitando qualquer movimento direto na lamínula.

12. LEITURA DA LÂMINA

Se a lâmina for lida usando o microscópio fluorescente convencional, ela pode ser lida imediatamente usando o procedimento padrão do laboratório. As lâminas devem sempre ser lidas por um usuário treinado que está familiarizado com interpretação e padrões de ANA fluorescentes. Consulte o fornecedor do microscópio fluorescente para obter instruções para usar o microscópio.

Se a lâmina for lida usando o Image Navigator®, o microscópio automatizado e o sistema de captura de imagem da Immuno Concepts, consulte o manual do operador para o sistema do Image Navigator®. O Image Navigator® deve ser operado apenas por usuário treinado.

PARA ASSISTENCIA TÉCNICA:

EUA: 1-800-251-5115 Fora dos EUA: 1-916-363-2649

Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

* Laboratórios que desejam fazer triagem em uma diluição diferente da recomendada devem validar o uso da diluição de triagem alternativa em sua população de pacientes.