



SISTEMA DE ENSAIO DE ANTICORPO FLUORESCENTE DE LKS DE ROEDORES HISTOFLUOR®

**Para uso em diagnóstico in vitro
Para uso profissional**

USO PRETENDIDO: Esse é um teste de anticorpos por técnica de fluorescência indireta para detecção qualitativa e semiquantitativa de anticorpos IgG em soro humano por meio de microscopia de fluorescência manual ou com microscópio semiautomatizado de fluorescência Image Navigator®. Esse sistema de ensaio deve ser usado como um auxílio na detecção de anticorpos antimitocondriais (AMA), anticélulas parietais (APCA) e antimúsculo liso (ASMA) associados à Hepatite Autoimune Tipo 1, à Colangite Biliar Primária e à Anemia Perniciosa/Gastrite Autoimune, juntamente com outras descobertas laboratoriais e clínicas. Um operador treinado deve confirmar os resultados gerados com o dispositivo semiautomatizado e software Image Navigator®.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Os anticorpos encontrados em humanos são direcionados a uma série de antígenos diferentes. Muitos desses antígenos são altamente conservados, de modo que epítopos antigênicos praticamente idênticos podem ser encontrados nos tecidos de animais e humanos. Por isso, o uso de tecidos de animais para detectar esses anticorpos é um procedimento laboratorial consagrado. Muitos dos autoanticorpos detectados em tecidos de animais estão intimamente associados a doenças autoimunes específicas em humanos. A detecção e quantificação de determinados autoanticorpos permite o diagnóstico e monitoramento de doenças autoimunes específicas (1,2).

PRINCÍPIO DO TESTE

O sistema de teste Histofluor® Rodent LKS da Immuno Concepts utiliza a técnica de imunofluorescência indireta descrita primeiramente por Weller e Coons (3). As amostras de pacientes são incubadas com substrato de antígeno (fígado/rim/estômago de roedores) para permitir a ligação específica dos anticorpos aos componentes da célula. Se os anticorpos estiverem presentes, um complexo antígeno-anticorpo estável é formado. Após a lavagem para remover anticorpos não específicos e não ligados, o substrato é incubado com um anticorpo anti-humano conjugado à fluoresceína. Quando os resultados são positivos, ocorre a formação de um complexo estável de três partes que consiste em um anticorpo fluorescente ligado a um anticorpo humano que é, por sua vez, ligado a um antígeno celular. Esse complexo pode ser visualizado com o auxílio de um microscópio fluorescente. Em amostras positivas, as células mostrarão uma fluorescência da cor verde maçã com uma característica de padrão de coloração referente à distribuição particular do antígeno com as células. Se a amostra for negativa para autoanticorpos, as células não mostrarão um padrão claramente perceptível de fluorescência.

COMPONENTES DO SISTEMA – MATERIAIS FORNECIDOS

Uso: Todos os componentes se apresentam prontos para uso sem a necessidade de alicotagem ou reconstituição (exceto o tampão fosfato salino que deve ser dissolvido em água deionizada ou destilada antes do uso).

Armazenagem: Todos os componentes podem ser armazenados refrigerados de 2 a 10°C. Após a reconstituição, o tampão fosfato salino deve ser armazenado em recipientes com tampa parafusada e temperatura de 2 a 25°C. O meio de montagem pode ser armazenado de 2 a 25°C.

Estabilidade: Todos os componentes permanecem estáveis por no mínimo 12 meses a partir da data de fabricação. Não use nenhum componente após a data de validade.

REAGENTES REATIVOS

Lâminas de substrato **SLIDE:** Seções finas (aproximadamente 4-5 micrómetros) de fígado, rim, estômago ou rim e estômago de roedores. Os tecidos foram fixados em uma mistura proprietária de acetona, álcoois e outros solventes orgânicos para preservar as proteínas dos tecidos em suas configurações originais. As lâminas estão disponíveis em lâminas para cultura com 4 divisórias (camundongo, número de catálogo 12004-02; rato, número de catálogo 12004-03) e em lâminas para cultura com 8 divisórias (camundongo, número de catálogo 12008-02; rato, número de catálogo 12008-03). As lâminas KS estão disponíveis em lâminas para cultura com 4 divisórias (camundongo, número de catálogo 12004-04; rato, número de catálogo 12004-05) e em lâminas para cultura com 8 divisórias (camundongo, número de catálogo 12008-04; rato, número de catálogo 12008-05).

Controle positivo de anticorpo antimitocondrial (AMA) **CONTROL|+:** Nº de catálogo 12021-02. Frasco conta-gotas pronto para uso contendo 1,0 ml de soro de controle humano positivo com anticorpo IgG específico para antígenos mitocondriais. Esse soro demonstra um padrão de coloração antimitocondrial positivo no substrato do tecido do roedor.

Soro de controle negativo **CONTROL|-:** Nº de catálogo 12031. Frasco conta-gotas pronto para uso contendo 1,0 ml de soro de controle humano negativo. Esse controle pode demonstrar coloração de fluorescência fraca, mas não mostra padrão distinguível.

Reagente de anticorpo fluorescente **CONJ|FITC:** Nº de catálogo 12009-02 (9,0 ml), 12075-02 (23 ml). IgG anti-humana de cabra (gama) conjugada para isotiocianato de fluoresceína (FITC - fluorescein isothiocyanate). O reagente vem pronto para uso em garrafas conta-gotas de precisão com 9,0 ml para 10 lâminas em kits de teste completos.

Controle positivo opcional **CONTROL|+:**

Nº de catálogo 12022-02 (0,5 ml) - Anticorpo de células Antiparietais (APCA). Frasco conta-gotas pronto para uso contendo 0,5 ml de soro de controle humano positivo com anticorpo IgG específico para antígenos de células parietais. Esse soro demonstra um padrão anticélula parietal positivo no substrato do tecido do roedor.

Nº de catálogo 12023-02 (0,5 ml) – Anticorpo antimúsculo liso (ASMA). Frasco conta-gotas pronto para uso contendo 0,5 ml de soro de controle humano positivo com anticorpo IgG específico para antígenos de músculo liso. Esse soro demonstra um padrão de coloração antimúsculo liso positivo no substrato do tecido do roedor.

Soros opcionais de controle titulável **TC:**

Nº de catálogo 12261-02 (0,25 ml) – AMA. Frasco pronto para uso contendo 0,25 ml de soro humano de controle antimitocondrial positivo para ser tratado como uma amostra não diluída do paciente. Consulte o rótulo do frasco para o valor da titulação.

Nº de catálogo 12262-02 (0,25 ml) – APCA. Frasco pronto para uso contendo 0,25 ml de soro humano de controle anticélula parietal positivo para ser tratado como uma amostra não diluída do paciente. Consulte o rótulo do frasco para o valor da titulação.

Nº de catálogo 12263-02 (0,25 ml) – ASMA. Frasco pronto para uso contendo 0,25 ml de soro humano de controle antimúsculo liso positivo para ser tratado como uma amostra não diluída do paciente. Consulte o rótulo do frasco para o valor da titulação.

COMPONENTES NÃO REATIVOS

Tampão fosfato salino em pó **PWDR|PBS:** Nº do catálogo 1011. Tampão fosfato salino em pó (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Cada embalagem contém tampão em pó suficiente para fazer um litro. (Uma embalagem de tampão em pó é fornecida para cada cinco lâminas nos kits de teste completo.)

Preparação: Dissolva uma embalagem de tampão em pó em um litro de água deionizada ou destilada, cubra e armazene a uma temperatura entre 2 e 25°C por até quatro semanas ou até que apresente sinais visíveis de contaminação ou outras alterações.

Meio de cultura de montagem semipermanente **SOLN|MM**: N° de catálogo 1111. Frasco conta-gotas pronto para uso contendo 5,0 ml de meio de cultura de montagem com base de glicerol.

Lamínulas **CVSLP**: N° do catálogo 1042. Cada pacote contém 10 lamínulas N° 1 de 24x64 mm.

MATERIAIS ADICIONAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Pipetas volumétricas para volumes de 30 a 40 µl
Jarra de Coplin ou pratos de coloração
Frasco de compressão ou pipetas de Pasteur
Pipetas sorológicas
Recipientes de um litro (para o tampão fosfato salino)
Água deionizada ou destilada
Tubos de teste para preparar diluições de soro
Papel de filtro ou toalhas de papel
Câmara de incubação
Luvas descartáveis
Cronômetro 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 nesse produto foram testados e são considerados negativos (não repetidamente reativo) para anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1), vírus da imunodeficiência humana-2 (HIV-2), vírus da hepatite C (HCV) e antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) por métodos aprovados pela FDA, agência que regulamenta alimentos e remédios nos EUA. Porém, nenhum método de teste pode oferecer garantia completa de que o HIV-1, HIV-2, hepatite C, hepatite B ou outros agentes infecciosos estejam ausentes. Por isso, todos os materiais do kit devem ser tratados da mesma forma que materiais potencialmente infecciosos.
2. Todas as amostras de pacientes devem ser tratadas em nível de biossegurança 2, conforme recomendado para qualquer soro ou espécie de sangue potencialmente infeccioso no Manual dos Centros de Controle e Prevenção de Doença/Institutos Nacionais de Saúde dos EUA: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. A diluição dos componentes ou substituição de componentes não fornecidos nesse sistema podem produzir resultados inconsistentes.
4. A azida de sódio (0,09%) é usada como conservante em alguns reagentes. A azida de sódio pode reagir com o encanamento de cobre ou chumbo e formar sais de azida de metal explosivos. Ao descartar os reagentes, lave com grandes volumes de água da torneira para evitar eventuais resíduos no encanamento. A azida de sódio é um veneno e pode ser tóxica se ingerida.
5. Esse kit é para uso diagnóstico *in vitro*.
6. Caso precisem ser usados soros hemolisados ou lipêmicos, aqueça os soros inativados durante 30 minutos a 56°C para obter melhores resultados. Soros contaminados por microrganismos não devem ser usados.
7. Não fume, coma ou beba em área onde amostras ou reagentes do kit são manuseados.
8. Evite derramamento ou geração de aerossol com frequência.
9. O tempo e as temperaturas de incubação não especificados podem fornecer resultados errôneos.
10. A contaminação cruzada de reagentes ou amostras podem fornecer resultados falsos.
11. Objetos de vidro reutilizáveis devem ser lavados e enxaguados abundantemente para remover detergentes antes do uso. Todos os objetos de vidro devem ser limpos e secos antes do uso.
12. Aguarde que todos os reagentes, lâminas e amostras estejam em temperatura ambiente (18-25°C) antes do uso.
13. Use luvas descartáveis quando manusear amostras e reagentes e posteriormente lave bem as mãos.
14. A contaminação de reagentes ou amostras por microrganismos podem fornecer resultados falsos.
15. Nunca pipete com a boca e evite contato de reagentes e amostras com a pele e membranas mucosas. Se o contato ocorrer, lave com sabão germicida e com grande quantidade de água.

COLETA DE AMOSTRAS

Coleta: O soro é a amostra de preferência. Aproximadamente 5 ml de sangue total deve ser coletado de forma asséptica por venopunção usando tubo coletor a vácuo estéril ou outro sistema de coleta apropriado. Permita que o sangue coagule em temperatura ambiente (18-25°C). O soro deve ser separado do coágulo por centrifugação, assim que possível, para minimizar a hemólise.

Substâncias interferentes: Os soros que exibem alto grau de hemólise, icterícia, lipemia ou crescimento de microrganismos não devem ser usados, porque essas condições podem ocasionar resultados anormais. As amostras que apresentem um problema particular visível devem ser purificadas por centrifugação antes do teste.

Armazenagem: Os soros devem ser armazenados a uma temperatura entre 2 e 10°C na primeira semana. Se o teste for prorrogado, os soros deverão ser congelados a, pelo menos, 20°C negativos. O soro não deve ser armazenado em um refrigerador ou congelador com degelo automático.

PRECAUÇÕES: O congelamento/descongelamento repetido de amostras de pacientes pode produzir 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 ter uma coloração fluorescente verde maçã brilhante nas estruturas apropriadas do tecido com um padrão claramente perceptível característico do soro de controle que foi usado. O controle negativo deve mostrar intensidade baixa, não específica, fluorescente de cor verde fosca no citoplasma e no núcleo, mas sem padrão perceptível de coloração. O controle do tampão fosfato salino é usado para observar colorações não específicas ao entrar em contato com o reagente do anticorpo e não deve exibir qualquer fluorescência verde. Se os controles não aparecem conforme descritos, o teste é inválido e deve ser repetido.

É importante que a intensidade da fluorescência não se confunda com a presença ou ausência de anticorpos. A aparência de um padrão claramente perceptível, independente da intensidade da coloração da fluorescência, é o fator principal a ser levado em consideração para determinar se uma solução de soro é positiva.

CONTROLES TITULÁVEIS OPCIONAIS

Os soros de controles tituláveis devem ser usados no monitoramento lote a lote e na reprodutibilidade execução a execução. Eles não têm a intenção de ser uma medição de sensibilidade geral ou especificidade do ensaio.

Ao ler os títulos, muitos laboratórios começam com a fonte que contém a amostra mais diluída e leem "no sentido inverso" até a diluição 1:20.

Os títulos médios e o alcance dos títulos (\pm uma diluição em qualquer lado da média) determinados para o número deste lote foram estabelecidos em nosso laboratório e são utilizados como um guia. Este controle é fornecido para permitir que cada laboratório avalie a reprodutibilidade (precisão) de seus testes. Já que este controle não tem a intenção de ser um indicador da precisão de títulos, cada laboratório deve estabelecer o ponto final de títulos médios para essa amostra, e deve utilizar essa informação para avaliar a reprodutibilidade (precisão) de execução para execução.

Por meio de inúmeros testes de controles de titulação, utilizando o sistema de teste de imunofluorescência Histofluor[®] Rodent LKS da Immuno Concept, o valor de um título médio foi estabelecido para cada número de lote. O número do lote, os títulos médios e o alcance dos títulos (\pm uma diluição dupla em qualquer lado de média) estão indicados na etiqueta do frasco e devem ser utilizados como guias para o desempenho do teste.

Os valores obtidos em nosso laboratório podem diferir dos seus valores.

Os fatores que afetam os resultados podem incluir, entre outros:

1. O tipo de fonte de luz usada. Fontes de luz de mercúrio produzirão maior energia de excitação a 495 nm que as de quartzo/halogênio. As fontes de energia de mercúrio de 50 watts, 100 watts e 200 watts diferem pouco quanto à energia de excitação a 495 nm. As fontes de luz de 100 watts de quartzo/halogênio produzirão maior energia de excitação a 495 nm do que as de 50 watts de quartzo/halogênio.
2. A condição e a idade da fonte de luz. Isso é particularmente verdadeiro para fontes de luz de mercúrio, que em geral exibem uma redução gradual na energia de excitação a 495 nm antes de queimar. Essa redução gradual na energia de excitação pode resultar em uma perda significativa de sensibilidade com o passar de várias semanas. Esse problema pode ser evitado ao manter um registro de controle. Para obter melhores resultados, substitua as lâmpadas de mercúrio de 50 watts a cada 100 horas de uso e as lâmpadas de 100 ou 200 watts a cada 200 horas de uso. Fontes de luz de quartzo/halogênio geralmente não exibem uma redução gradual na energia de excitação antes de queimar.
3. O tipo de filtro excitador usado. Os filtros excitadores de interferência proporcionam maior sensibilidade em um comprimento de onda muito mais estreito que os filtros excitadores de absorção. Consulte o manual do microscópio fluorescente ou o representante de vendas para obter mais informações.
4. Alinhamento apropriado do caminho de luz do microscópio. Consulte o manual do microscópio fluorescente para obter instruções.

5. A abertura numérica da objetiva. Com fluorescência de luz incidente (Epi), a fluorescência é aumentada exponencialmente conforme a abertura numérica (NA - numerical aperture) da objetiva é aumentada adicionalmente. Isso pode fazer com que uma objetiva de 40X com uma NA de 0,65 leia uma ou mais diluições menores que uma objetiva de 40X com um NA de 0,85. A abertura numérica está impressa ao lado da objetiva.
6. Filtros de supressão. Os filtros de supressão reduzem determinados comprimentos de onda de excitação e podem ser usados para reduzir a sensibilidade. Consulte o manual do microscópio fluorescente ou o representante de vendas para obter mais informações.
7. Precisão e acurácia da técnica de diluição, equipamento e desempenho dos procedimentos de teste.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO PACIENTE

Uma ampliação total de 100X é recomendada para exame positivo/negativo, ao passo que uma ampliação total de 200X é recomendada para reconhecimento de padrões.

Negativo: Um soro será considerado negativo se não houver nenhum padrão claramente perceptível. O tecido pode demonstrar coloração fraca, mas sem padrão claramente perceptível.

Positivo: Um soro é considerado positivo se o tecido mostrar um padrão de coloração claramente perceptível.

Títulos: Ao ler os títulos, muitos laboratórios começam com a fonte que contém a amostra mais diluída e leem "no sentido inverso" até a diluição 1:20. A primeira fonte em que um padrão claramente discernível é visível é o parâmetro do título. Recomendamos esta técnica para determinar os parâmetros do título. É importante que a intensidade da coloração não seja confundida com a presença ou ausência de células de anticorpos antimitocondriais ou antiparietais. O fator chave a se considerar para determinar se uma dada diluição de soro é positiva é o surgimento de um claro padrão discernível, independente da intensidade da coloração.

RELATÓRIO DOS RESULTADOS

Exame: Os resultados devem ser relatados como positivos ou negativos na diluição 1:20, e o padrão de coloração deve ser relatado.

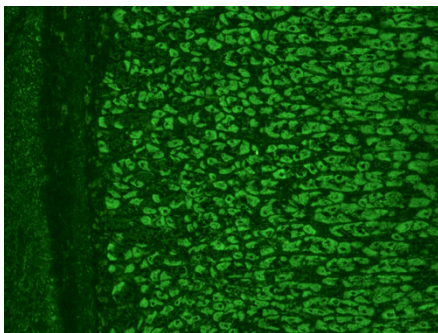
Titulação: Os resultados devem ser relatados conforme a última diluição serial em que a coloração claramente discernível é vista. Os resultados com uma forte reação na diluição 1:320 devem ser relatados como maiores que 1:320.

DETECÇÃO DO PADRÃO

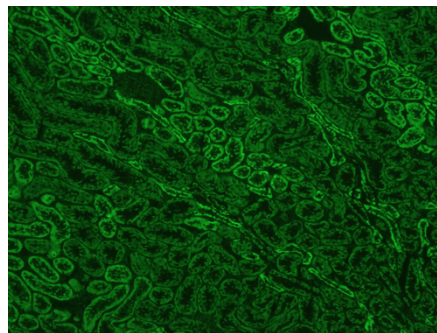
Anticorpos antimitocondriais (AMA): Coloração citoplasmática granular das células de Kupffer e dos hepatócitos na seção do fígado; coloração citoplasmática granular também é vista nos túbulos renais, com a coloração mais forte nos túbulos distais, os quais são mais ricos em mitocôndrias do que os túbulos proximais; o citoplasma das células gástricas também mostra coloração granular, com coloração mais forte nas células parietais do que nas células principais.

Antígeno: O antígeno mais comumente detectado na mitocôndria é o M2, que é um complexo de vários peptídeos antigênicos do complexo piruvato desidrogenase (PDH - pyruvate dehydrogenase).

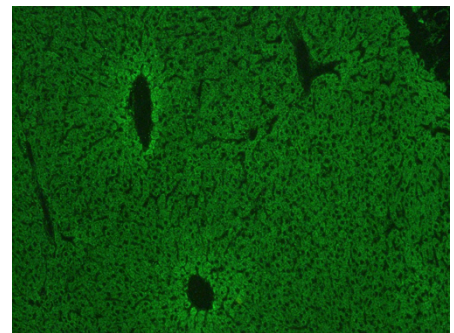
Associação à doença: 95% dos pacientes com cirrose biliar primária (PBC) (4,5) apresentam AMA.



AMA em estômago de roedores



AMA em rim de roedores

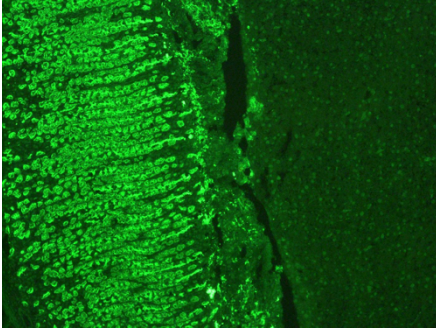


AMA em fígado de roedores

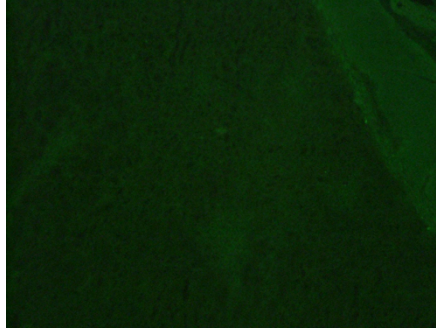
Anticorpos de células Antiparietais (APCA): No estômago, o tecido mostra coloração citoplasmática granular brilhante das células parietais em padrão linear paralelo, sem nenhuma coloração das células principais. O antígeno não é expresso em rins ou fígados de roedores, portanto esses tecidos são negativos, apenas com fluorescência de fundo.

Antígeno: O antígeno é a bomba de prótons H⁺K⁺ATPase.

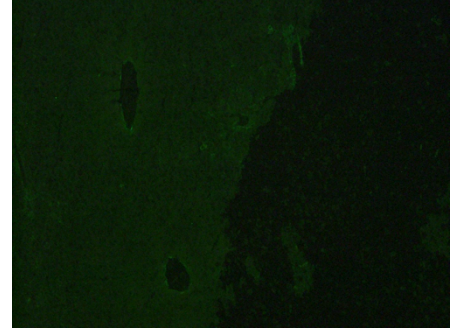
Associação à doença: Os APCA estão presentes em mais de 90% de pacientes com anemia perniciosa. A gastrite atrófica é frequentemente uma precursora da anemia perniciosa, portanto, os anticorpos também podem ser vistos em pacientes com gastrite atrófica autoimune (6,7).



APCA em estômago de roedores



APCA em rim de roedores (negativo)

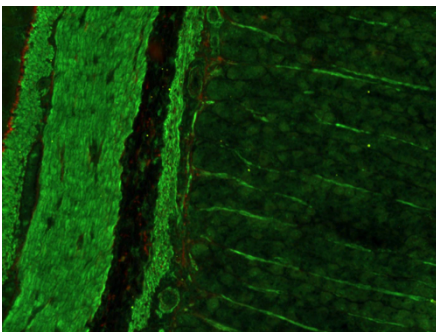


APCA em fígado de roedores (negativo)

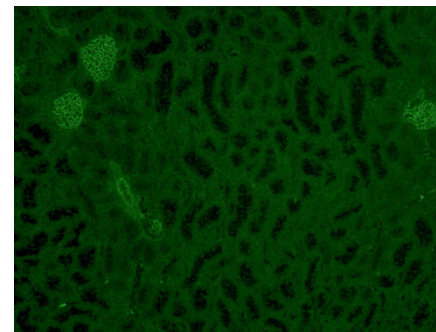
Anticorpo antimúsculo liso (ASMA): No estômago, o tecido mostra uma coloração brilhante das fibras de músculo liso na camada muscular própria, na camada muscular da mucosa, na área intergástrica da glândula e nas camadas de músculo liso das artérias. No fígado, o tecido mostra a coloração brilhante das fibras de músculo liso nas paredes das artérias. No rim, altos títulos de anticorpos antiactina podem ter reação cruzada com títulos de fibras no glomérulo.

Antígeno: A actina é o antígeno clinicamente mais importante, mas os anticorpos para vimentina, tubulina, desmina e outras proteínas nas fibras do músculo liso também foram descritas.

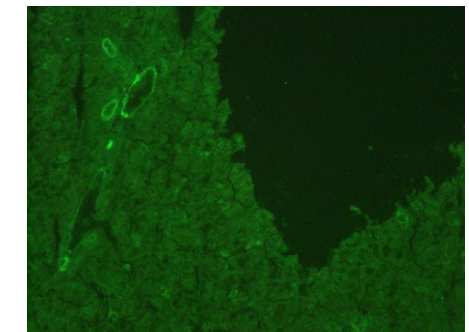
Associação à doença: Hepatite crônica autoimune (tipo 1) (8-10).



ASMA em estômago de roedores



ASMA em rim de roedores



ASMA em fígado de roedores

LIMITAÇÕES DO TESTE

1. O diagnóstico não pode ser feito com base apenas na detecção do antígeno em tecido de roedores. O médico deve interpretar esses resultados em conjunto com o histórico e sintomas do paciente, achados físicos e outros procedimentos diagnósticos.
2. O tratamento não deve ser iniciado com base apenas no teste positivo para anticorpos. As indicações clínicas, outros achados laboratoriais e a impressão clínica do médico devem ser considerados antes de qualquer tratamento ser iniciado.
3. Apesar de serem altamente sugestivas quanto à presença de doença no tecido conectivo, as reações positivas não devem ser consideradas diagnósticas, mas sim observadas como parte do histórico clínico geral de um paciente.
4. Os padrões de coloração podem mudar com a titulação progressiva dos soros. Esse fenômeno ocorre geralmente devido à presença de mais de uma condição de enfermidade.
5. Por causa das várias opções disponíveis em microscópios fluorescentes, recomenda-se que as fontes de luz, os filtros e as lentes sejam padronizados ao comparar títulos de pacientes entre laboratórios.
6. A Immuno Concepts recomenda o uso de células cultivadas e transfectadas (HEp-2000[®]) para determinar ANA e não defende o uso de tecido de roedores para detecção ou identificação de ANA.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

O sistema de ensaio de LKS de roedores Histofluor[®] foi comparado a outro kit de ensaio de anticorpos imunofluorescentes de tecidos de roedores que se encontra em distribuição comercial usando 170 amostras clinicamente caracterizadas. As amostras foram testadas em três locais e lidas por três operadores em cada local. Usando a microscopia fluorescente convencional, os dados abaixo foram obtidos. Os valores de concordância representam decisão final de consenso das duas melhores das três considerações dos três locais.

Tecido de Rato

Concordância positiva: 92,3% (79,0 a 98,1)
Concordância de padrão: 92,3% (79,0 a 98,1)
Concordância negativa: 97,8% (93,4 a 99,5)
Concordância geral: 98,2% (94,7 a 99,6)

Tecido de Camundongo

Concordância positiva: 94,4% (80,9 a 99,4)
Concordância de padrão: 94,4% (80,9 a 99,4)
Concordância negativa: 98,5% (94,5 a 99,9)
Concordância geral: 98,8% (95,5 a 99,9)

USE COM O IMAGE NAVIGATOR[®]

O Image Navigator[®] é o sistema de microscópio semiautomatizado da Immuno Concepts para leituras de lâminas fluorescentes Histofluor[®]. Uma comparação da leitura do monitor do Image Navigator[®] em relação à leitura convencional de lâminas de tecidos de roedores fluorescente do sistema de ensaio de LKS de roedores Histofluor[®] foi realizada usando 170 amostras clinicamente caracterizadas testadas em três locais e lidas por três operadores em cada local. Os valores de concordância representam decisão final de consenso das duas melhores das três considerações dos três locais.

Tecido de Rato

Concordância positiva: 100% (87,9 a 100)
Concordância de padrão: 100% (87,9 a 100)
Concordância negativa: 100% (96,6 a 100)
Concordância geral: 100% (97,3 a 100)

Tecido de Camundongo

Concordância positiva: 100% (88,5 a 100)
Concordância de padrão: 100% (88,5 a 100)
Concordância negativa: 100% (96,7 a 100)
Concordância geral: 100% (97,3 a 100)

A sensibilidade clínica para a detecção de anticorpos em pacientes que conhecidamente têm Anemia Perniciosa, Hepatite Autoimune Tipo 1 ou Colangite Biliar Primária é mostrada nas tabelas abaixo. Nesses estudos, uma diluição de corte de 1:20 foi usada para determinar amostras positivas.

Sensibilidade Clínica (95% CI)		Histofluor [®] -Fígado/Rim Estômago de Camundongo			
Diagnóstico	N	Convencional	% Positiva	Image Navigator [®]	% Positiva
Anemia Perniciosa	12	5	41.7% (19.3-68.1)	5	41.7% (19.3-68.1)
Hepatite Autoimune Tipo 1	19	9	47.4% (27.3-68.3)	9	47.4% (27.3-68.3)
Colangite Biliar Primária	18	15	83.3% (60.0-95.0)	15	83.3% (60.0-95.0)

Sensibilidade Clínica (95% CI)		Histofluor [®] -Fígado/Rim Estômago de Rato			
Diagnóstico	N	Convencional	% Positiva	Image Navigator [®]	% Positiva
Anemia Perniciosa	12	6	50.0% (25.4-74.6)	6	50.0% (25.4-74.6)
Hepatite Autoimune Tipo 1	19	9	47.4% (27.3-68.3)	9	47.4% (27.3-68.3)
Colangite Biliar Primária	18	15	83.3% (60.0-95.0)	15	83.3% (60.0-95.0)

A especificidade clínica foi determinada em um grupo de 121 pacientes com doenças autoimunes diferentes de Anemia Perniciosa, Hepatite Autoimune Tipo 1 ou Colangite Biliar Primária. Os dados dessas comparações são mostrados na tabela abaixo. Nesses estudos, uma diluição de corte de 1:20 foi usada para determinar amostras positivas.

Especificidade Clínica (95% CI)		Histofluor [®] -Fígado/Rim Estômago de Rato			
Grupo	N	Convencional	% Negativa	Image Navigator [®]	% Negativa
Pacientes Autoimunes	121	113	93.4% (87.3-96.8)	113	93.4% (87.3-96.8)

Especificidade Clínica (95% CI)		Histofluor [®] -Fígado/Rim Estômago de Camundongo			
Grupo	N	Convencional	% Negativa	Image Navigator [®]	% Negativa
Pacientes Autoimunes	121	114	94.2% (88.3-97.4)	114	94.2% (88.3-97.4)

Precisão: De acordo com as exigências do CLSI EP05-A3, treze amostras foram testadas de forma triplicada em dez eventos em três locais independentes. O conjunto de amostras incluía quatro amostras positivas de AMA, quatro amostras positivas de APCA, quatro amostras positivas de ASMA e uma amostra negativa. Cada resultado foi lido de forma convencional e no Image Navigator[®] por dois leitores. Para demonstrar os dados em um formato semiquantitativo, a concordância final filtrada é mostrada abaixo para cada local e entre locais. Todas as concordâncias foram > 90,0%.

Reprodutibilidade de vários locais e vários leitores (% de concordâncias com IC de 95%)								
Substrato	Medição	n	Conventional			Monitor (Semiautomatizado)		
			Site 1 v 2	Site 1 v 3	Site 2 v 3	Site 1 v 2	Site 1 v 3	Site 2 v 3
RATO	Positiva	720	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)
	Negativa	60	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)
	Padrão	720	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)
	± 1 Titer	720	95.4% (93.6-96.7)	95.8% (94.1-97.1)	96.5% (94.9-97.7)	95.3% (93.5-96.6)	95.3% (93.5-96.6)	96.7% (95.1-97.8)
CAMUNDONGO	Positiva	720	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)
	Negativa	60	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)
	Padrão	720	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)
	± 1 Titer	720	94.9% (93.0-96.3)	97.8% (96.4-98.7)	94.4% (92.5-95.9)	96.8% (95.2-97.9)	98.9% (97.8-99.5)	96.5% (94.9-97.7)

BIBLIOGRAFIA

1. Nakamura RM, Chisari FV, Edington TS. Laboratory tests for diagnosis of autoimmune diseases. Prog Clin Pathol. 1975;6:177-203.
2. Craig WY, Ledue TB, Collins MF, et al. Serologic associations of anti-cytoplasmic antibodies identified during anti-nuclear antibody testing. Ciin Chem Lab Med. 2006;44:1283-1286.
3. Weller TH, Coons AH Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. Proc Soc Exp Biol Med. 1954;86:789-794.
4. Jones DEJ. Autoantigens in primary biliary cirrhosis. J Clin Pathol. 2000;53:813-821.
5. Purohit T, Cappell MS. Primary biliary cirrhosis: Pathophysiology, clinical presentation and therapy. World J Hepatol. 2015;7:926-941.
6. Toh B-H. Pathophysiology and laboratory diagnosis of pernicious anemia. Immunol Res. 2017;65:326-330.
7. De Aizpurua HJ, Cosgrove LJ, Ungar B, Toh B-H. Autoantibodies cytotoxic to gastric parietal cells in serum of patients with pernicious anemia. NEJM. 1983;309:625-629.
8. Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Clinical significance of autoantibodies and autoimmune hepatitis. J Autoimm. 2013;46:17-24.
9. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, et al. Autoantibodies and defined target the auto antigens in autoimmune hepatitis: an overview. Eur J Intern Med. 2002;13:293-303.
10. Czaja AJ. Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. J Hepatol. 1999;30:394-401.

Em caso de dano ao pacote de proteção, entre em contato com a Immuno Concepts antes do uso.



Fabricante



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Limite de temperatura



Contém o suficiente para <n> testes



Consulte as instruções de uso



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Alemanha



Prescrição (Rx) apenas - apenas para prescrição médica

Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
Suporte técnico EUA: 1.800.251.5115 Demais países: 1.916.363.2649
E-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 12000-02-I,

4.11.02.003.140-Pt

Rev 2.1

© Copyright 2019

PROCEDIMENTO DE TESTE FLUORESCENTE HISTOFLUOR® EM TECIDO DE ROEDOR

OBSERVAÇÃO: Se o laboratório estiver usando um sistema de processamento de amostras automatizado, o procedimento e as recomendações do fabricante do processador deverão ser seguidos. O sistema de processamento de lâminas deverá ser programado para as diluições apropriadas da amostra, volumes de distribuição e tempos de incubação descritos abaixo

- 1. TAMPÃO DE RECONSTITUIÇÃO (FOSFATO SALINO)**
Dissolva o conteúdo de uma embalagem de tampão em um litro de água deionizada ou destilada. O tampão fosfato salino pode ser coberto e armazenado entre 2 e 25°C por até quatro semanas.
- 2. AMOSTRAS DE DILUIÇÃO DO PACIENTE**
Exame: Dilua as amostras do paciente na proporção de 1:20 adicionando 0,05 ml (50 µl) de soro a 0,95 ml (950 µl) de tampão fosfato salino reconstituído.
Titulação semiquantitativa: Faça diluições seriais de amostra(s) de triagem, e o controle titulável. (por exemplo, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320) usando Tampão Fosfato Salino (PBS).
- 3. PREPARE AS LÂMINAS DE SUBSTRATO (30-40 µl/poço)**
Remova as lâminas da embalagem e posicione os soros controle em poços de controle conforme descrito a seguir: Inverta os frascos conta-gotas de controle e aperte gentilmente até que a gota fique visível na ponta. Toque gentilmente a gota no poço de controle apropriado, mas evite o contato direto da ponta do conta-gotas com a superfície da lâmina. Adicione 1 gota (30-40 µl) da amostra do paciente aos poços numerados.
OBSERVAÇÃO: Em exame geral, é recomendado o controle positivo antimitocondrial. Para titulação semiquantitativa, um Controle Titulável, número de catálogo 12261-02, 12262-02 ou 12263-02, deve ser executado 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.
PRECAUÇÕES: O CONTATO DIRETO DA PONTA DO CONTAGOTAS COM A SUPERFÍCIE DA LÂMINA PODE RESULTAR EM DANO AO SUBSTRATO DO ANTÍGENO.
- 4. LÂMINAS DE INCUBAÇÃO (30 ± 5 minutos em temperatura ambiente, ou seja, de 18 a 24°C)**
Posicione as lâminas em uma câmara úmida coberta (uma placa de Petri com papel toalha umedecido será adequada). Incube, com a tampa posicionada, por 30 minutos (± 5 minutos) em temperatura ambiente (18 a 24°C).
- 5. ENXÁGUE DO TAMPÃO FOSFATO SALINO**
Remova as lâminas da bandeja do incubador e enxágue levemente com tampão fosfato salino usando um frasco injetor, uma pipeta de Pasteur ou uma pipeta sorológica. Não injete o tampão diretamente nos poços.
OBSERVAÇÃO: Para evitar contaminação cruzada das lâminas, direcione a corrente do tampão fosfato salino pela linha do meio da lâmina, titulando primeiro em direção à coluna superior dos poços seguido pela titulação em direção à coluna inferior dos poços.
- 6. LAVAGEM DE TAMPÃO FOSFATO SALINO (10 minutos)**
Lave as lâminas por 10 minutos com o tampão fosfato salino em uma bandeja de coloração ou uma jarra de Coplin para coloração de lâminas. Essa lavagem pode ser estendida em 10-30 minutos sem variabilidade nos resultados do teste final. Descarte a solução de lavagem do tampão fosfato salino após o uso.
- 7. REAGENTE DO ANTICORPO FLUORESCENTE (cubra os poços com 12-14 gotas)**
Remova uma lâmina por vez do tampão fosfato salino. Dê uma batida na lateral da lâmina contra o papel filtro ou toalha de papel para remover o excesso de tampão. Retorne a lâmina imediatamente para a câmara de incubação e cubra completamente os poços usando reagente de anticorpo fluorescente; inicie posicionando uma gota sobre cada poço. Repita esse procedimento para cada lâmina. O reagente de anticorpo fluorescente foi titulado para compensar o tampão residual restante na lâmina após o enxágue.

OBSERVAÇÃO: É importante que os poços da lâmina não sequem durante esse procedimento, caso contrário, pode ocorrer dano ao substrato.
NÃO ABSORVA OU SEQUE A LÂMINA DE NENHUMA FORMA. NÃO PERMITA QUE A LÂMINA DESCANSE SEM O REAGENTE DE ANTICORPO FLUORESCENTE POR MAIS DE 15 SEGUNDOS.

- 8. LÂMINAS DE INCUBAÇÃO (30 ± 5 minutos em temperatura ambiente, ou seja, de 18 a 24°C)**
Coloque uma tampa da câmara de incubação e cubra com um papel toalha para evitar exposição à luz se a câmara não for opaca. Permita que as lâminas sejam incubadas por 30 minutos (± 5 minutos) em temperatura ambiente (18 a 24°C).
- 9. ENXÁGUE DO TAMPÃO FOSFATO SALINO**
Remova as lâminas da bandeja do incubador e enxágue levemente com tampão fosfato salino. Não injete o tampão diretamente nos poços.
- 10. LAVAGEM DE TAMPÃO FOSFATO SALINO (10 minutos)**
Lave as lâminas por 10 minutos com o tampão fosfato salino em uma bandeja de coloração ou uma jarra de Coplin para coloração de lâminas. Essa lavagem pode ser estendida em 10-30 minutos sem variabilidade nos resultados do teste final quando a coloração de contraste não for usada.
- 11. MONTAGEM DA LAMÍNULA**
Remova uma lâmina por vez do tampão fosfato salino. Dê uma batida na lateral da lâmina contra o papel filtro ou toalha de papel para remover o excesso de tampão.
NÃO ABSORVA OU SEQUE A LÂMINA DE NENHUMA FORMA. NÃO PERMITA QUE DESCANSE SEM LAMÍNULA POR MAIS DE 15 SEGUNDOS. Adicione 4-5 gotas de meio de montagem semipermanente ao longo da linha mediana de cada lâmina. Posicione cuidadosamente a lamínula no local correto e evite bolsas de ar elevando cuidadosamente a lamínula de uma extremidade da lâmina para outra.
OBSERVAÇÃO: O excesso de meio de montagem da lâmina pode resultar em alta fluorescência de fundo, devido à dispersão da luz ou falta de resolução clara das células (imagem borrada). O excesso do meio de montagem pode ser removido da lâmina ao absorver cuidadosamente a lamínula com papel absorvente ou papel de lente e simultaneamente evitar qualquer movimento direto da lamínula.
- 12. LEIA A LÂMINA**
Se a lâmina for lida usando microscopia fluorescente convencional, ela pode ser lida imediatamente usando o procedimento padrão do laboratório. As lâminas sempre devem ser lidas por um usuário treinado que esteja familiarizado com a interpretação e os padrões da seção de tecido fluorescente. Consulte o fornecedor do microscópio fluorescente para instruções para uso do 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® captura imagens digitais de cada fonte e apresenta uma visão panorâmica da seção do tecido para revisão do usuário treinado. O Image Navigator® deve ser operado apenas por usuário treinado.

Para obter assistência técnica:
EUA: 1-800-251-5115 Demais países: 1-916-363-2649
E-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com

