



SISTEMA DE TESTE DE FLUORESCENTE PARA AUTOANTICORPO ANTI-ENDOMISIO (EmA) HISTOFLUOR®

***Para uso em diagnóstico in vitro
Somente para exportação
Para uso profissional***

USO PRETENDIDO: Este é um teste de imunofluorescência indireta para detecção qualitativa e semiquantitativa de autoanticorpos antiendomisial no soro humano. Este sistema de teste deve ser usado como auxiliar na detecção de anticorpos associados à doença celíaca e à dermatite herpetiforme.

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 epítomos 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).

PRINCÍPIO DO TESTE

O sistema de teste de imunofluorescência da Immuno Concept utiliza a técnica de imunofluorescência indireta descrita primeiramente por Weller e Coons (2). As amostras de pacientes são incubadas com substrato de antígeno 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 e as lamínulas podem ser armazenados em temperatura ambiente (18-25°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]: Nº do catálogo 12004-01, 12008-01. Seções finas (de aproximadamente 4 a 5 micrômetros) do esôfago distal de primatas.

Controle positivo de anticorpo específico antiendomisial [CONTROL +]: Nº do catálogo 12021-01. Frasco conta-gotas pronto para uso contendo 1,0 ml de soro de controle humano positivo com anticorpo específico para antígenos endomisiais. Esse soro demonstra um padrão de coloração antiendomisial positivo no substrato do tecido do primata.

Soro de controle negativo [CONTROL -]: Nº do 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 [CONJFITC]: Nº do catálogo 12009-01 (9,0 ml), 12075-01 (23 ml). IgA anti-humana de cabra conjugada para isotiocianato de fluoresceína (FITC). O reagente vem pronto para uso em garrafas conta-gotas de precisão com 9,0 ml para 10 lâminas em kits de teste completos.

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]: Nº do catálogo 1111. Frasco conta-gotas pronto para uso contendo 5,0 ml de meio de montagem com base de glicerol. Esse reagente pode ser armazenado em temperatura ambiente (18-25°C).

Lamínulas [CVSLP]: Nº do catálogo 1042. Cada pacote contém 10 lamínulas de vidro Nº 1 de 24x64 mm. As lamínulas podem ser armazenadas em temperatura ambiente (18-25°C).

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. 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. Todos os materiais de origem animal usados para este produto foram obtidos de instalações aprovadas pelos EUA ou USDA (Departamento de Agricultura dos EUA).
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 tecido, 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 será inválido e deverá 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.

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.

- 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.
- Alinhamento apropriado do caminho de luz do microscópio. Consulte o manual do microscópio fluorescente para obter instruções.
- 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.
- 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.
- 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 a coloração for menor ou igual ao controle negativo sem 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.

INTENSIDADE DA FLUORESCÊNCIA

A intensidade da fluorescência pode ser semiquantitativa, de acordo com as diretrizes de reagentes de anticorpo fluorescentes estabelecidos pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças, Atlanta, Georgia (CDC) mostradas a seguir.

- 4+ Verde amarelada brilhante (fluorescência máxima), contorno bem definido.
- 3+ Fluorescência verde amarelada menos brilhante, contorno bem definido.
- 2+ Padrão definido, mas fluorescência fosca.
- 1+ Fluorescência muito suavizada.

Uma lâmina padrão para a determinação dessas intensidades de fluorescência, FITC QC Slide™, número de catálogo 1900, será disponibilizada pela Immuno Concepts, N.A. Ltd.

RELATÓRIO DOS RESULTADOS

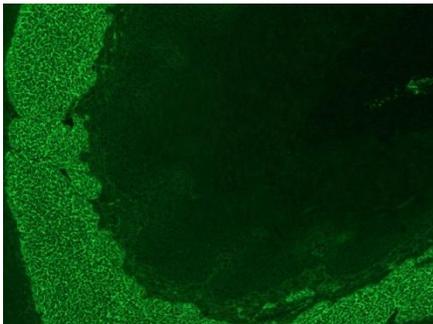
Exame: Os resultados devem ser relatados como positivos ou negativos na diluição 1:5, e o padrão de coloração deve ser relatado.

DETECÇÃO DO PADRÃO

Anticorpos antiendomisiais (EMA): Uma fina rede de fibras é vista ao redor das células musculares lisas na mucosa muscularis

Antígeno: Transglutaminase tecidual na bainha endomisial ao redor das células musculares lisas.

Associação à doença: Os anticorpos endomisiais são vistos em 95-100% dos pacientes não tratados com doença celíaca.

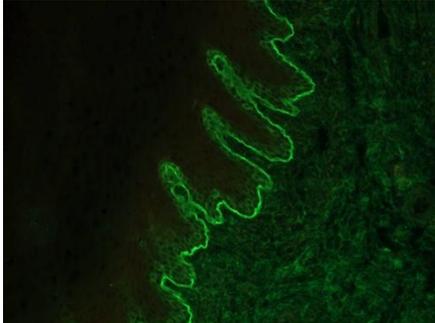


Anticorpos antiendomisiais

Anticorpos para antimembrana basal: Coloração proeminente da área da membrana basal ao longo da junção dermoepidérmica.

Antígeno: O antígeno foi identificado como sendo uma proteína transmembranar de 180 kDa (BP 180).

Associação à doença: Esses anticorpos são associados ao pénfigoide bolhoso e foram detectados em aproximadamente 70% dos pacientes com essa doença.

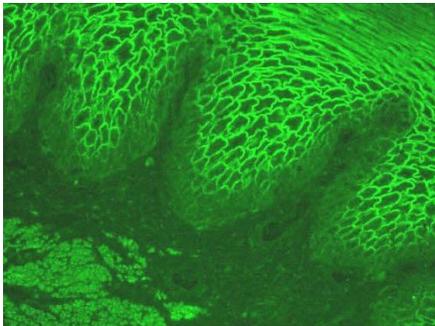


Anticorpos para antimembrana basal

Anticorpo para cimento intracelular: Coloração do material intracelular na camada epitelial estratificada do esôfago.

Antígeno: O antígeno foi identificado como sendo uma proteína desmogleína 3 de 130 kDa.

Associação à doença: Esses anticorpos são associados à forma ativa do pénfigo vulgar e foram detectados em aproximadamente 90% dos pacientes com essa doença.



Anticorpo para cimento intracelular

LIMITAÇÕES DO TESTE

1. O diagnóstico não pode ser feito com base apenas na detecção do antígeno em tecido. 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, 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 frequentemente se alteram 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.

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



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 12000-01-I, 4.11.02.003.142-Pt Rev 1.2 © Copyright 2019

PROCEDIMENTO DE TESTE DE FLUORESCENTE PARA AUTOANTICORPO ANTI-ENDOMISIO (EMA) HISTOFLUOR®

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 10°C por até quatro semanas.

2. AMOSTRAS DE DILUIÇÃO DO PACIENTE

Exame: Dilua as amostras do paciente na proporção de 1:5 adicionando 0,100 ml (100 µl) de soro a 0,400 ml (400 µl) de tampão fosfato salino reconstituído.

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 triagem geral, é recomendado o controle positivo antiendomisial. Para titulações semiquantitativas, selecione o controle positivo ilustrando os padrões mais similares de fluorescência na amostra da triagem (por exemplo, para amostras de pacientes produzindo padrões antiendomisiais de fluorescência na triagem, use controle positivo antiendomisial).

PRECAUÇÕES: O CONTATO DIRETO DA PONTA DO CONTA-GOTAS 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 a 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 meio de montagem semipermanente suficiente para cobrir os poços de cada lâmina. Posicione cuidadosamente a lamínula no local correto e evite bolsas de ar baixando 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.

PARA OBTER ASSISTÊNCIA TÉCNICA:

EUA: 1-800-251-5115 Demais países: 1-916-363-2649

E-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com

