



PT

ASA (Esôfago de Macaco)

REF FA6001

IVD

Rx Only



USO PRETENDIDO

O kit de Anticorpos Antipele (ASA) foi projetado para a detecção qualitativa e semiquantitativa de anticorpos associados ao pênfigo e ao penfigoide bolhoso por meio da técnica de ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) e é destinado ao uso diagnóstico *in vitro*.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A maioria das autoridades concorda que estudos de anticorpos séricos em todos os casos suspeitos de pênfigo vulgar (PV) e penfigoide bolhoso (PB) são recomendados (1 - 4). Anticorpos específicos são demonstráveis em praticamente todos os casos ativos, especialmente se testes repetidos forem realizados em diferentes estágios da doença (1). O substrato mais frequentemente recomendado para esses estudos de anticorpos séricos é o esôfago de macaco (6). Tanto os anticorpos específicos de PV quanto os de PB podem ser detectados em uma única análise utilizando este substrato. Os anticorpos de PV reagem com as substâncias intercelulares entre o epitélio escamoso do esôfago de macaco, e os anticorpos de PB reagem com a membrana basal da camada de células epiteliais escamosas (1, 4 e 6). A coloração de anticorpos antinucleares nos núcleos das células epiteliais escamosas pode ocorrer se o soro for obtido de pacientes com lúpus sistêmico ou outros distúrbios do tecido conjuntivo (7). Pode ser detectada coloração intercelular distinta em casos de pênfigo vegetante, pênfigo foliáceo (incluindo a forma brasileira) e pênfigo eritematoso (1). Embora um único teste sorológico não seja suficiente para determinar a dosagem da terapia medicamentosa no pênfigo vulgar (PV), uma redução de dois ciclos no título é uma indicação de controle eficaz do processo da doença. Embora alguma correlação entre título e atividade da doença seja encontrada no pênfigo bolhoso (BP), o valor prognóstico é inferior ao do pênfigo vulgar (PV) devido às flutuações no título. Estudos séricos podem ser diagnósticos de pênfigo vulgar (PV) ou pênfigo bolhoso (BP); no entanto, é frequentemente recomendável realizar estudos imunológicos diretos em biópsias de lesões cutâneas (1, 2). Estudos de imunofluorescência direta em biópsias de pele podem ser facilitados com o ZEUS Tissue Fixative and Wash Solution, preparado de acordo com Michel (5). Este novo fixador elimina a necessidade de congelamento imediato da amostra de biópsia e permite o transporte de biópsias de tecidos frescos da pele e de outros tecidos por até 5 dias em temperaturas ambiente.

PRINCÍPIO DA ANÁLISE

O ASA (Esôfago de Macaco) foi projetado para detectar a presença de anticorpos circulantes contra pênfigo e pênfigo bolhoso em soro humano. A análise utiliza tecido de esôfago de macaco como substrato e imunoglobulina anti-humana de cabra ajustada para diluição ótima de uso e livre de coloração de fundo não específica. A reação ocorre em dois passos:

1. O primeiro passo é a interação dos anticorpos anti-pele no soro do paciente com o esôfago de macaco.
2. O segundo passo é a interação da imunoglobulina anti-humana marcada com FITC com os anticorpos ligados ao cimento intercelular das células epiteliais no pênfigo, ou à zona da membrana basal no pênfigo bolhoso, em uma análise positiva (consulte a seção Procedimento da Análise para mais detalhes).

O ASA (Esôfago de Macaco) detectará tanto os anticorpos contra pênfigo vulgar (PV) quanto os anticorpos contra pênfigo bolhoso (BP). A análise é uma ferramenta laboratorial particularmente útil no diagnóstico de pênfigo vulgar (PV) e pênfigo bolhoso (BP), pois a maioria dos pacientes não tratados com doença ativa apresentará anticorpos anti-pele em seu soro.

REAGENTES

Materiais Fornecidos:

Cada kit contém os seguintes componentes em quantidades suficientes para realizar o número de testes indicado na etiqueta da embalagem. **OBSERVAÇÃO: O conjugado e os controles contêm uma combinação de Proclin (0,05% v/v) e Azida de Sódio (<0,1% p/v) como conservantes.**

SLD	1	Lâminas de Substrato de Esôfago de Macaco: Dez lâminas de 8 poços com almofada absorvente e bolsa dessecante.
CONJ.	2	Conjugado: Imunoglobulina anti-humana (IgG) de cabra marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Contém tampão fosfato com BSA e corante de contraste. Dois frascos de 3,5 mL, com tampa âmbar. Pronto para usar.
CTRL + 1	3	Controle positivo de PV (Soro Humano): Produzirá coloração das células epiteliais escamosas do substrato. Um frasco de 0,5 mL, com tampa vermelha . Pronto para usar.
CTRL + 2	4	Controle positivo de BP (Soro Humano): Produzirá coloração da membrana basal do substrato. Um frasco de 0,5 mL, com tampa azul . Pronto para usar.
CTRL -	5	Controle negativo (Soro Humano): Não produzirá coloração no substrato. Um frasco de 0,5 mL, com tampa verde . Pronto para usar.
BUF PBS		Solução salina tamponada com fosfato (PBS): pH 7,2 ± 0,2. Vazie o conteúdo de cada pacote de tampão em um litro de água destilada ou desionizada. Misture até que todos os sais estejam completamente dissolvidos. Dois pacotes, suficientes para preparar 2 litros.
MNTMED		Meio de Montagem (Glicerol Tamponado): Um frasco de 3,0 mL, com tampa branca e ponta dosadora.
COVGLS		Vidro de cobertura Pacote com doze lâminas de 24 x 60 mm, espessura #1.

OBSERVAÇÕES:

- Os seguintes componentes não são dependentes do número de lote do kit e podem ser usados de forma intercambiável com os Sistemas de Teste Sebia IFA, desde que os números dos produtos sejam idênticos: Meio de Montagem (Número do Produto: FA0009S), PBS (Número do Produto: 0008S) e Lâminas de Cobertura (Número do Produto: S8007).

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

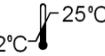
- Microscópio automatizado diFine® ou um microscópio de fluorescência adequadamente equipado.
- Pequenas pipetas serológicas, de Pasteur, capilares ou automáticas.
- Pontas de pipeta descartáveis.
- Pequenos tubos de ensaio, 13 x 100 mm ou comparáveis.
- Suportes para tubos de ensaio.
- Recipiente de coloração: Um grande recipiente de coloração com um pequeno sistema magnético de mistura oferece um mecanismo ideal para lavar as lâminas entre as etapas de incubação.
- Água destilada ou deionizada.
- Microscópio de fluorescência devidamente equipado.
- Cilindro Graduado de 1 Litro.
- Temporizador de laboratório para monitorar os passos de incubação.
- Bacia de descarte, luvas descartáveis e desinfetante (ex: água sanitária doméstica a 10% – 0,5% de hipoclorito de sódio).

Os seguintes sistemas de filtros, ou seus equivalentes, foram considerados satisfatórios para uso rotineiro com conjuntos de campo escuro de luz transmitida ou incidente:

Iluminação transmitida		
Fonte de luz: Vapor de mercúrio 200W ou 50W		
Filtro de Excitação	Filtro de Excitação	Filtro de Excitação
KP490	KP490	KP490
BG12	BG12	BG12
FITC	FITC	FITC
Fonte de luz: Tungstênio – Halógeno 100W		
KP490	KP490	KP490

Luz incidente			
Fonte de luz: Vapor de mercúrio 200, 100, 50 W			
Filtro de Excitação	Filtro de Excitação	Filtro de Excitação	Filtro de Excitação
KP500	KP500	KP500	KP500
FITC	FITC	FITC	FITC
Fonte de luz: Tungstênio – Halógeno 50 e 100 W			
KP500	KP500	KP500	KP500
FITC	FITC	FITC	FITC

CUIDADOS DE ARMAZENAMENTO

	Kit Fechado.
	Meio de Montagem, Conjugado, Lâminas, Controles Positivo e Negativo.
	PBS reidratado (estável por 30 dias).
	Pacotes de solução salina tamponada com fosfato (PBS).

PRECAUÇÕES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Siga as precauções normais ao manipular reagentes laboratoriais. No caso de contato com os olhos, enxaguar imediatamente com água em abundância e consultar um médico. Use vestuário de proteção adequado, luvas e proteção para os olhos/rosto. Não inale os vapores. Descarte os resíduos observando todas as leis locais, estaduais e federais.
3. Os poços da lâmina não contêm organismos viáveis. No entanto, considere a lâmina como **material potencialmente biológico perigoso** e manuseie-a adequadamente.
4. Os controles são **materiais potencialmente biológicos perigosos**. Os materiais de origem dos quais esses produtos foram derivados foram considerados negativos para o antígeno HIV-1, HBsAg e para anticorpos contra HCV e HIV, por métodos de teste aprovados. No entanto, como nenhum método de teste pode oferecer total garantia de que agentes infecciosos estão ausentes, esses produtos devem ser manipulados no Nível de Biossegurança 2, conforme recomendado para qualquer soro humano ou amostra de sangue potencialmente infecciosa no manual dos Centros de Controle de Doenças/Institutos Nacionais de Saúde "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories": edição atual; e o Padrão da OSHA para Patógenos Transmitidos pelo Sangue (20).
5. A aderência ao tempo e temperatura especificados para as incubações é essencial para resultados precisos. **Todos os reagentes devem ser deixados atingir a temperatura ambiente (20 - 25° C) antes de iniciar o ensaio**. Devolva os reagentes não utilizados aos seus recipientes originais imediatamente e siga os requisitos de armazenamento.
6. Lavagem inadequada pode causar resultados falso-positivos ou falso-negativos. Certifique-se de minimizar a quantidade de PBS residual, pressionando com papel absorvente, antes de adicionar o conjugado. Não deixe os poços secarem entre as incubações.
7. O conjugado e os controles contêm azida de sódio em uma concentração de <0,1% (w/v). Foi relatado que a azida de sódio pode formar azidas de chumbo ou cobre nas tubulações laboratoriais, o que pode causar explosões ao bater. Para prevenir, enxágue bem a pia com água após descartar a solução contendo azida de sódio. Este conservante pode ser tóxico se ingerido.
8. A diluição ou adulteração desses reagentes pode gerar resultados errôneos.
9. Nunca pipete pela boca. Evite o contato de reagentes e amostras de pacientes com a pele e mucosas.
10. Evite a contaminação microbiana dos reagentes. Resultados incorretos podem ocorrer.
11. A contaminação cruzada de reagentes e/ou amostras pode causar resultados errôneos.
12. O material de vidro reutilizável deve ser lavado e enxaguado completamente, sem resíduos de detergentes.
13. Evite respingos ou geração de aerossóis.
14. Não exponha os reagentes à luz intensa durante o armazenamento ou incubação.
15. Permitir que o pacote de lâminas atinja a temperatura ambiente antes de abrir o envelope protetor ajudará a proteger os poços e o papel absorvente da condensação.
16. Colete a solução de lavagem em uma bacia de descarte. Trate a solução de resíduos com desinfetante (ex: água sanitária doméstica a 10% - 0,5% de hipoclorito de sódio). Evite a exposição dos reagentes aos vapores de água sanitária.

17. Não exponha nenhum dos reagentes reativos a soluções contendo água sanitária ou a odores fortes provenientes de soluções com água sanitária. Quantidades traço de alvejante (Hipoclorito de Sódio) podem destruir a atividade biológica de muitos dos reagentes reativos dentro deste kit.
18. Não aplique pressão sobre o envelope da lâmina. Isso pode danificar o substrato.
19. Os componentes deste kit são ajustados para otimizar a sensibilidade e a reprodutibilidade. Reagentes de outros fabricantes não devem ser trocados. Siga o folheto informativo com atenção.
20. Os componentes não abertos/abertos são estáveis até a data de validade impressa no rótulo, desde que as condições de armazenamento recomendadas sejam rigorosamente seguidas. Não use após a data de validade. Não congelar.
21. O corante de contraste Evans Blue é um potencial carcinógeno. Se ocorrer contato com a pele, lave com água. Descarte de acordo com as regulamentações locais.
22. Não deixe as lâminas secarem durante o procedimento. Dependendo das condições do laboratório, pode ser necessário colocar as lâminas em uma câmara úmida durante as incubações.

COLETA DE AMOSTRAS

1. Realize a coleta de amostras de acordo com o documento CLSI M29: Proteção dos Trabalhadores de Laboratório contra Doenças Infecciosas Adquiridas Ocupacionalmente. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer garantia completa de que amostras de sangue humano não transmitirão infecções. Portanto, todos os derivados de sangue devem ser considerados potencialmente infecciosos.
2. Somente soro recém-coletado e devidamente refrigerado, obtido por procedimentos aprovados de punção venosa asséptica, deve ser utilizado nesta análise (8). Não devem ser adicionados anticoagulantes ou conservantes. Evite usar soro hemolisado, lipêmico ou contaminado por bactérias.
3. Armazene a amostra à temperatura ambiente por no máximo 8 horas. Se o teste não for realizado dentro de 8 horas, o soro pode ser armazenado entre 2 - 8 C, por no máximo 48 horas. Se houver previsão de atraso no teste, armazene o soro para teste a -20 C ou mais baixo. Evite ciclos múltiplos de congelamento/descongelamento, pois isso pode causar perda da atividade dos anticorpos e resultar em resultados errôneos. É responsabilidade do laboratório individual utilizar todas as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para determinar os critérios de estabilidade para seu laboratório (11).

PROCEDIMENTO DA ANÁLISE

1. Retire as lâminas do armazenamento refrigerado e deixe-as atingir a temperatura ambiente (20 - 25 C). Abra o envelope protetor e retire as lâminas. **Não aplique pressão nas laterais planas do envelope protetor.**
2. Identifique cada poço com o soro do paciente e os controles apropriados. **OBSERVAÇÃO: Os controles devem ser utilizados sem diluição.** Prepare uma diluição 1:10 (por exemplo: 10µL de soro + 90µL de PBS) de cada soro de paciente.
Opções de Diluição:
 - a. Os usuários podem titular o controle positivo até o ponto final para servir como um controle semi-quantitativo (1+ Reagente Minimante). Nesses casos, o controle deve ser diluído em dois volumes de PBS. Uma diluição de ponto final é estabelecida e impressa no frasco do controle positivo (\pm uma diluição). Deve-se observar que, devido a variações dentro do laboratório (equipamento, etc.), cada laboratório deve estabelecer seu próprio título de ponto final esperado para cada lote de controle positivo.
 - b. Ao titrar as amostras dos pacientes, as diluições iniciais e todas as subseqüentes devem ser preparadas apenas em PBS.
3. Lave as lâminas por 3 a 5 minutos em PBS.
4. Retire as lâminas do PBS e seque-as com papel absorvente de seis poços. Sugere-se que o papel absorvente seja colocado em uma superfície plana. Em seguida, coloque a lâmina de substrato na posição invertida sobre o papel absorvente. Pressione firmemente a parte de trás da lâmina. Não permita que o substrato de tecido seque durante todo o procedimento do teste.
5. Com um dispensador adequado (listado acima), dispense 20 µL de cada controle e de cada soro de paciente diluído nos poços apropriados.
6. Incube as lâminas à temperatura ambiente (20 - 25 C) por 35 \pm 5 minutos.
7. Lave suavemente as lâminas com PBS. **Não direcione um jato de PBS nos poços de teste.**
8. Lave as lâminas por dois intervalos de 5 minutos, trocando o PBS entre as lavagens.
9. Retire as lâminas do PBS uma de cada vez. Vire a lâmina e posicione os poços nas cavidades dos blotters fornecidos. Seque a lâmina pressionando o lado reverso com um lenço absorvente. **CUIDADO:** Posicione o papel absorvente e a lâmina em uma superfície dura e plana. A secagem com toalhas de papel pode danificar a matriz da lâmina. **Não deixe as lâminas secarem durante o procedimento do teste.**
10. Adicione 20-40 µL de conjugado a cada poço.
11. Repita as etapas 6 a 9.
12. Aplique de 3 a 5 gotas de meio de montagem em cada lâmina entre os poços e coloque o vidro de cobertura. Alternativamente, pode-se aplicar uma pequena quantidade de meio de montagem em cada poço e colocar o vidro de cobertura. Examine as lâminas imediatamente com um microscópio de fluorescência apropriado.

OBSERVAÇÃO: Se houver atraso na observação das lâminas, selar o vidro de cobertura com esmalte transparente e armazená-las na geladeira. Recomenda-se que as lâminas sejam examinadas no mesmo dia do teste.

CONTROLE DE QUALIDADE

1. Sempre que a análise for realizada, um controle positivo e um controle negativo devem ser incluídos.
2. Recomenda-se que os controles positivo e negativo sejam lidos antes de avaliar os resultados do teste. Isso ajudará a estabelecer as referências necessárias para interpretar a amostra do teste. Se os controles não aparecerem conforme descrito, os resultados são inválidos.
 - a. Controle negativo – caracterizado pela ausência de coloração fluorescente das células epiteliais escamosas e/ou da zona da membrana basal.
 - b. Controles positivos – O controle positivo de PV é caracterizado por qualquer coloração fluorescente verde maçã entre as células epiteliais escamosas. O controle positivo de BP é caracterizado pela coloração específica da zona da membrana basal.
3. Controles adicionais podem ser testados de acordo com as diretrizes ou requisitos das regulamentações locais, estaduais e/ou federais ou de organizações de acreditação.

OBSERVAÇÕES:

- a. **A intensidade da fluorescência observada pode variar com o microscópio e o sistema de filtros utilizados.**
- b. **Ocorre retenção inespecífica de reagentes. É importante lavar as lâminas adequadamente para evitar resultados falso-positivos.**

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

1. Qualquer coloração verde maçã das estruturas específicas mencionadas acima, em uma escala de 1+ a 4+, é considerada positiva. Um 1+ é considerado uma reação fraca, e 4+ uma reação forte. Todos os soros positivos em uma diluição 1:10 devem ser titulados até a diluição de término. Isso é realizado fazendo diluições seriadas de 1:20, 1:40, 1:80, etc., de todos os soros positivos. O término é a maior diluição que produz uma reação positiva discernível. A coloração nuclear específica dos núcleos das células epiteliais é considerada um teste positivo para anticorpos antinucleares, que podem estar associados ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e outras doenças do tecido conjuntivo.
2. Títulos inferiores a 1:10 são considerados negativos.
3. Teste positivo:
 - a. A coloração intercelular específica entre as células epiteliais escamosas é considerada um teste positivo para anticorpos contra pênfigo.
 - b. A coloração específica da zona da membrana basal é considerada um teste positivo para pênfigo bolhoso.

LIMITAÇÕES DA ANÁLISE

1. O ASA (Esôfago de Macaco) é uma ferramenta laboratorial e, por si só, não é diagnóstico.
2. Os resultados devem ser interpretados à luz da condição clínica do paciente.
3. Não se pretende estabelecer uma associação definitiva entre o padrão de fluorescência e qualquer estado específico da doença com este produto.
4. Sem padrão de potência nos EUA.

REFERÊNCIAS

1. Estudo cooperativo. Uses for Immunofluorescence test of skin and sera. Utilization immunofluorescence in the diagnosis of Bullous diseases, Lupus Erythematosus, and certain other dermatoses. Arch. Dermatol. 111:372-381, 1975.
2. Jablonski S, Chorzelski TP, Beutner EH, *et al*: Indications for skin and serum immunofluorescent studies in dermatology. In: Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S, *et al* (Eds): Immunopathology of the Skin. Stroudsburg, PA, Dowden, Hutchinson e Ross, pp. 1-24, 1973.
3. Chorzelski TP, Jablonski S, Beutner EH: Clinical significance of pemphigus antibodies in: Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S, *et al* (Eds): Immunopathology of the Skin, Stroudsburg, PA, Dowden, Hutchinson, and Ross. pp. 25-43, 1973.
4. Lever WF: Pemphigus and Pemphigoid. Springfield, IL, Charles C. Thomas, editor. pp. 3-226, 1965.
5. Michel B, Milner Y, David K: Preservation of Tissue-Fixed immunoglobulins in skin biopsies of patients with lupus erythematosus and bullous diseases: Preliminary report. J. Invest. Dermatology 59: 449-454, 1973.
6. Anderson P, Hale WL: Immunohistology of human antibodies on monkey esophagus, In: Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S, *et al* (Eds): Immunopathology of the Skin. Stroudsburg, PA, Dowden, Hutchinson e Ross: pp. 271-286, 1973.
7. Tan EM, Vaughn JH: antinuclear antibodies: Significance of biochemical specificities, In Beutner EH, Chorzelski TP, Bean S, *et al* (Eds): Immunopathology of the Skin. Stroudsburg, PA, Dowden, Hutchinson e Ross: pp. 367-378, 1973.
8. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture – Second Edition: approved Standard (1984). Publicado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards.
9. Lennette DA: Collection and preparation of specimens for virological examination. In: Manual of Clinical Microbiology, 4th ed., EH Lennette, A Balows, WJ Hausler, and HJ Shadomy (Eds): American Society for Microbiology, Washington, DC. Ch. 61, pp. 687-693, 1985.
10. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
11. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). Documento CLSI GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.

GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS

Os seguintes símbolos **podem** ter sido usados na rotulagem deste produto.

Símbolo	Descrição	Símbolo	Descrição
	Fabricante	SLD	Lâmina de Substrato
IVD	Dispositivo médico diagnóstico para uso <i>in vitro</i>	BUF PBS	Tampão PBS
REF	Número do catálogo	MNTMED	Meios de Montagem
	Suficiente para <i>n</i> testes	CONJ.	Conjugado
LOT	Código do lote	CTRL + 1	Controle Positivo de PV
	Utilizado por	CTRL -	Controle Negativo
	Limitações de Temperatura de Armazenamento	CTRL + 2	Controle Positivo de BP
RX Only	Somente para Uso com Receita Médica	Made in the USA	Fabricado nos EUA
	Consulte as instruções eletrônicas de uso		Armazenar na posição vertical
	Manter longe da luz solar	COVGLS	Vidro de cobertura
CE	Conformidade com a Diretiva 98/79		



ZEUS Scientific.

200 Evans Way, Branchburg, Nova Jersey, 08876, USA

Ligação gratuita (EUA): 1-800-286-2111, Opção 2

Internacional: +1 908-526-3744

Fax: +1 908-526-2058

Site: www.zeusscientific.com

Para atendimento ao cliente nos EUA, entre em contato com seu distribuidor local.

Para suporte técnico dos EUA, entre em contato com a ZEUS Scientific, ligue gratuitamente ou escreva um e-mail [para](mailto:support@zeusscientific.com): support@zeusscientific.com.

Para consultas de Atendimento ao Cliente e Suporte Técnico fora dos EUA, entre em contato com seu distribuidor local.

© 2019 ZEUS Scientific. Todos os direitos reservados.



EMERGO EUROPE
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands