



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 



AUTOANTIBODY TEST SYSTEM

IVD	PRODUCT INSERT
REF	1102-60 60 Determinations
REF	1102 100 Determinations
REF	1102-120 120 Determinations
REF	1103 200 Determinations
REF	1103-120 120 Determinations
REF	1103-240 240 Determinations
REF	1103-480 480 Determinations
REF	1103-512 512 Determinations
REF	1125 HEp-2/Mouse Kidney COMVI I 100 Determinations
REF	1134 HEp-2/Mouse Kidney/Stomach COMVI II 100 Determinations

INTENDED USE

Indirect immunofluorescence (IF) antibody tests for the detection and quantitation of anti-nuclear antibodies (ANA) [REF] 1102, 1102-120, 1103, 1103-480, 1103-512, 1102-60, 1103-120, 1103-240, 1125, 1134, anti-mitochondrial antibodies (AMA), anti-smooth muscle antibodies (ASMA) [REF] 1125, 1134 and anti-gastric parietal cell antibodies (AGPA) [REF] 1134 in human serum.

SUMMARY AND EXPLANATION

Antinuclear antibodies (ANA), detected by indirect immunofluorescence, aid in the diagnosis of connective tissue disorders including systemic lupus erythematosus (SLE), mixed connective tissue disease, Sjögren's syndrome and scleroderma¹⁻⁵. ANA occur in about 95% of SLE patients as well as patients with other connective tissue diseases. ANA may also occur in other disorders such as chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis⁶⁻⁸.

Anti-mitochondrial antibodies (AMA) occur in over 90% of primary biliary cirrhosis cases, 3-11% of chronic active hepatitis patients and are absent in patients with extra-hepatic biliary obstruction and in other liver diseases. The universal presence of anti-mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis and their virtual absence in extra-hepaticjaundice makes their detection of considerable value in the differential diagnosis⁶⁻¹².

Anti-smooth muscle antibodies (ASMA) in high titer (>160) occur in the majority of cases of chronic active hepatitis and in intermediate titers (40-80) in acute viral hepatitis. Occasionally they may occur in cases of primary biliary cirrhosis where they are also found in intermediate titers. The significance of titers of 20-40 is doubtful since these titers may occur in normal individuals^{13,14}.

Anti-gastric parietal cell antibodies (AGPA) are commonly associated with pernicious anemia and chronic atrophic gastritis where they occur in about 90% and 50% of cases, respectively. However, they are not disease specific as they may occur in low frequency in other disorders. Although healthy individuals may have gastric parietal cell antibodies, this finding may reflect asymptomatic atrophic gastritis. Negative findings for gastric parietal cell antibodies provide strong evidence for excluding pernicious anemia¹⁵⁻¹⁷.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

In the indirect IF method used in this kit, patients' sera are incubated on a variety of substrates (HEp-2 cells or HEp-2 cells and mouse kidney/stomach sections) to allow binding of antibodies. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled, anti-human IgG conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of ANA, ASMA, AMA and AGPA is demonstrated by an apple green fluorescence of specific histologic structures in the tissue. The titers (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) are then determined by testing serial dilutions¹⁸.

PRODUCT INFORMATION

Storage and preparation

Store all reagents at 2-8°C. Reagents are ready for use after equilibration to room temperature.

Materials provided

HEp-2Cells [REF] 1103-120, 1103-240, 1102-60, 1102, 1102-120, 1103, 1103-480, 1103-512

HEp-2/Mouse Kidney COMVI I [REF] 1125

HEp-2/Mouse Kidney-Stomach COMVI II [REF] 1134

HEp-2 substrate	[SORB] [SLD] [6]	6 well HEp-2 substrate slides (20x [REF] 1102-120)
	[SORB] [SLD] [10]	10 well HEp-2 substrate slides (10x [REF] 1102, 6x [REF] 1102-60, 10x [REF] 1103)
	[SORB] [SLD] [12]	12 well HEp-2 substrate slides (10x [REF] 1103-120, 20x [REF] 1103-240, 40x [REF] 1103-480)
	[SORB] [SLD] [16]	16 well HEp-2 substrate slides (32x [REF] 1103-512)
HEp-2/mouse kidney substrate	[SORB] [SLD] [10]	10 well HEp-2/mouse kidney substrate slides (10x [REF] 1125)

EN

HEp-2/mouse kidney stomach substrate

SORB | **SLD** | **10**

10 well HEp-2/mouse kidney stomach substrate slides (10x **REF** 1134)

1 x 0.5 ml

CONTROL | **+** | **ANA** *

ANA positive control. Contains human serum.

1 x 0.5 ml

CONTROL | **+** | **AMA** *

AMA positive control. Contains human serum. (**REF** 1125, 1134)

1 x 0.5 ml

CONTROL | **-** *

Negative control. Contains human serum.

5 ml

IgG-CONJ | **FITC** | **EB** *

Anti-human IgG FITC conjugate containing Evan's blue counterstain. Protect from light. (1x **REF** 1102-60, 2x **REF** 1102, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 3x **REF** 1103, 1103-240, 6x **REF** 1103-480, 1103-512)

60 ml

BUF *

Buffered diluents. (1x **REF** 1102, 1102-60, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 2x **REF** 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)

Vial

BUF | **WASH**

Phosphate buffered saline (PBS). Dissolve each vial into 1L distilled or deionized water. (2x **REF** 1102, 1102-60, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 3x **REF** 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)

5 ml

MOUNTING | **MEDIUM** *

Mounting medium. Do not freeze. (1x **REF** 1102, 1102-60, 1125, 1134, 2x **REF** 1102-120, 1103, 1103-120, 3x **REF** 1103-240, 4x **REF** 1103-480, 1103-512)

12 per box

COVER | **SLD**

Coverslips. (1x **REF** 1102, 1102-60, 2x **REF** 1102-120, 1103-120, 1103, 3x **REF** 1103-240, 1103-480)

12 per box

COVER | **SLD**

Long coverslips. (1x **REF** 1125, 1134, 3x **REF** 1103-512)

Optional Components

5 ml

IgG-CONJ | **FITC** *

Anti-human IgG FITC conjugate. Protect from light. **REF** 2100






1 ml

EVANS

Evan's blue counterstain. **REF** 2510.

* ANA patterns (standard set), AMA, ASMA, AGPA controls

Symbols used on labels:

- LOT** Lot number
- REF** Catalog number
-  Use by
-  Storage temperature
-  Read instructions for use
- IVD** In vitro diagnostic use
-  Manufacturer
-  Number of Tests

Material required but not provided

- Fluorescence microscope
- Micropipette or Pasteur pipette
- Serological pipettes
- Staining dish (e.g. Coplin jar)
- Small test tubes (e.g. 13 x 75 mm) and test tube rack
- Distilled or deionized water
- 1 liter container
- Paper towels
- Incubation chamber

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HbsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regard-less of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹⁹.

EN

WARNING – Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc. Do not use beyond expiration date.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Test Method

A. Screening

Patient sera to be reacted on slides with HEp-2 substrate only should be diluted using 1:40 screening dilution. It is recommended that patient sera to be reacted on slides with HEp-2/mouse kidney or HEp-2/mouse kidney stomach substrates should be diluted 1:10 and 1:40 for screening on these substrates. On mouse kidney and stomach sections a specific reaction at 1:10 dilution or greater titer is considered positive. On HEp-2 a specific reaction at 1:40 or greater titer is considered positive.

1. Dilute each patient serum 1:10 (with the Buffered Diluent provided 20 µl serum + 180 µl diluent) and/or 1:40 (10 µl serum + 390 µl diluent). Do not dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for 10-15 minutes. Carefully remove the slides without touching the substrate.
3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Invert dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl) of the Negative Control to well #1. Similarly apply 1 drop of ANA Positive Control to well #2. If applicable, 1 drop of AMA Positive Control to well #3 (1125, 1134). Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur Pipette, apply 1 drop of patient's diluted serum (approximately 50 µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides 30 minutes at room temperature.
7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately 10 ml PBS using a pipette, or rinse slide in beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash 10 minutes. Repeat process with all remaining slides.
8. Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the Conjugate dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl) to each well.
9. Repeat steps **7 and 8** for each slide.
10. Replace the lid on the incubation chamber. Incubate 30 minutes at room temperature.
11. Remove a slide from incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for 10 minutes. If optional conjugate without counterstain is used (see optional components in Materials Provided Section), 2-3 drops of Evan's Blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.
12. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **To prevent slide from drying, proceed immediately with next step while slide is still wet.**
13. Mount the coverslip by applying **3 drops** of Mounting Medium evenly on the coverslip and place coverslip over slide. Avoid applying undue pressure and prevent lateral movement of the coverslip.
14. Repeat steps 12 and 13 for each slide.
15. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater.

Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed for up to 48 hours. Slides should be stored in the dark at 2-8°C.

B. Endpoint Determination (titration)

A serum positive in the screening test may be further tested following steps 5 through 13 to determine the appropriate screening dilution for the substrate (1:10 for HEp-2/mouse kidney or HEp-2/mouse kidney stomach, 1:40 for HEp-2 only). Each test run should include the Positive and Negative Controls. Make serial two-fold dilutions starting at 1:10. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

Preparation of Serial Dilutions Starting at 1:10

To create serial dilutions of a patient sample from 1:10 to 1:320, begin by numbering six tubes from 1 through 6. More tubes may be used if a higher final dilution is desired. Add 0.9 ml of Sample Diluent to tube 1 and 0.2 ml to tubes 2 through 6. Pipette 0.1 ml of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer 0.2 ml from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring 0.2 ml from one tube to the next after mixing to yield the dilutions depicted in the following table:

Tubes	1	2	3	4	5	6
Serum	0.1 ml					
	+					
Buffered Diluent	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		⇌	⇌	⇌	⇌	⇌
Transfer		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Final dilution	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Serum	0.1 ml					
	+					
Buffered Diluent	3.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		⇌	⇌	⇌	⇌	⇌
Transfer		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Final dilution	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280 etc.

QUALITY CONTROL

Both a Positive and Negative Control should be included with each test run. The Negative Control should show no specific fluorescence of the nuclei, smooth muscle, tubules of the kidney or gastric parietal cells. The AMA Positive Control should have 2+ or greater staining intensity of the tubules of the kidney. The ANA Positive Control should have 2+ or greater staining intensity of the nuclei of the kidney and HEp-2 with a predominantly homogeneous pattern.

If expected results are not obtained, the run should be repeated. If inadequate results continue to occur with the controls, these may be due to:

- Turbidity. Discard and use another control
- Problems with the optical system of the fluorescence microscope. These may include: improper alignment, bulb beyond useful life expectancy, etc.
- Allowing the slide to dry during the procedure.

INTERPRETATION OF RESULTS

Results should be reported as negative, positive, or, if end-point titer has been determined, positive with titer. On mouse kidney and mouse kidney stomach substrates it is recommended that patient samples demonstrating specific fluorescence reactions associated with ANA, AMA, ASMA and AGPA at a dilution of 1:10 be reported as positive. On HEp-2 substrate it is recommended that patient samples demonstrating specific fluorescence reactions at a dilution of 1:40 be reported as positive. This should serve as a guide in the interpretation of results. Each laboratory must determine its own normal values to account for differences in microscopy systems, personnel and training.

Read only fields which contain specific staining of the nuclei of the kidney and HEp-2 cells and the pattern observed for ANA, the kidney tubules for AMA, the kidney blood vessel walls for ASMA and gastric parietal cells only for AGPA. All other reactions should be reported as negative for ANA, AMA, ASMA and/or AGPA.

ANA can be detected on all substrates but should be quantified on the kidney or HEp-2 cells. The nuclear staining patterns observable with the kidney substrate or HEp-2 cells provided include homogeneous, peripheral (rim), speckled and nucleolar. The centromere staining pattern (including mitotic figures) is seen most easily on HEp-2 cells. These nuclear staining patterns are described below. They may be one or a combination of several staining patterns. The latter are due to reactions to several different nuclear antigens.

Homogeneous: The entire nucleus fluoresces evenly with a diffuse staining pattern.

Nuclear The nuclear membrane stains most intensely as fine linear pattern

Membranous: with decreasing staining intensity of the nucleoplasm towards the center of the nucleus.

Speckled: Discrete coarse to fine round speckles fluoresce throughout the nucleus.

Nucleolar: The nucleoli stain as multiple solid bodies within the nucleus.

Centromere: Large speckles of finite number. Reactive antigen segregates with condensed chromosomes in cells undergoing mitosis⁵.

The specificity of some of the antibodies giving the above staining patterns may be further identified by tests for antibodies to nDNA and to various extractable nuclear antigens. These may be of diagnostic significance as listed in Table 1 at the end of this document.

EN

AMA may be observed on both the distal and proximal tubules of the kidney with the distal tubules staining more brightly. Even though the cytoplasm of the gastric parietal cells also stains, AMA should be quantitated on the kidney.

Staining of the stomach muscularis and kidney glomeruli may also be observed with ASMA, but only ASMA seen on the blood vessel walls of the kidney should be reported.

On HEp-2 cells, detectable cytoplasmic antibodies include anti-mitochondrial antibodies (AMA) and anti-smooth muscle antibodies (ASMA). In an AMA pattern, the cytoplasm appears granular, whereas the ASMA pattern is a fibrillar network of staining throughout the cytoplasm. Both patterns should be reported as negative for ANA. AGPA only reacts on the parietal cells of the stomach and provides cytoplasmic reactions. Negative reactions on kidney with positive reactions on stomach are indicative of AGPA.

LIMITATION OF THE PROCEDURE

In some cases, sera positive for ANA may either be very weak or negative at the initial screening dilution (prozone phenomenon). In such doubtful cases the sera should be screened at higher dilutions and, if positive, antibody titers determined.

In some cases the presence of two or more antibodies in a serum which are reactive with the same substrate may cause an interference in their detection by immunofluorescence. This interference may cause either failure to detect ANA or suppression of its titer if the interfering antibody has a higher titer than ANA. All ANA reactions should be reported.

The goat anti-human IgG FITC Conjugate supplied in this kit is primarily heavy chain specific but has some light chain activity. It reacts primarily with IgG class autoantibodies, but may, to a lesser degree, react with light chains of other classes such as IgM.

A positive ANA should not be considered diagnostic of SLE by itself. They also occur in patients with other connective tissue diseases and certain drugs such as procainamide and hydralazine may induce a positive ANA¹. Moreover, sera of patients with malignancies and infectious diseases may also have positive ANA²⁰.

The clinician should consider the results of all positive indirect immunofluorescence tests along with the results of other laboratory tests and the clinical condition of the patient when making a diagnosis.

EXPECTED VALUES

As seen in Tables 2, 3, 4 and 6 at the end of this document, tests for nuclear antibodies are used to screen for SLE and certain other immunologic disturbances. AMA occur in over 90% of cases of primary biliary cirrhosis and 3-11% of cases of chronic hepatitis. ASMA occur in the majority of cases of chronic active hepatitis and AGPA are commonly associated with pernicious anemia and chronic atrophic gastritis.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The ImmGlo™ Autoantibody Test System was compared with another commercially available fluorescent antibody test using HEp-2 cells as a substrate. The comparison included 15 serum samples from normal subjects as well as sera from patients with the diagnosis of SLE, subacute cutaneous lupus erythematosus, scleroderma or rheumatoid arthritis. Sera were tested according to the procedure and screening dilution recommended by the manufacturer. These yielded comparable results as summarized below:

Comparison of Kits Using HEp-2 Cell Substrate for the Detection of Antinuclear Antibodies

Clinical Condition	No. of Sera	% Positive	
		Immco™	Other
SLE	12	100	100
Subacute Cutaneous LE (SCLE)	7	85	85
Scleroderma	6	100	100
Rheumatoid Arthritis	10	50	30
Normal Controls	15	0	0

The ImmGlo™ Autoantibody Test System (Mouse Kidney/Stomach Sections) was compared with another commercially available fluorescent antibody test using mouse kidney/stomach as a substrate. The comparison included: 20 samples of ANA positive sera, 19 samples of AMA positive sera, 19 samples of ASMA positive sera, 20 samples of AGPA positive sera and 38 serum samples from normal subjects. Sera were tested starting at a 1:10 dilution with the procedure recommended by the manufacturer. These yielded comparable results as summarized in Tables 7 and 8 at the end of this document.

ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

IVD	ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ
REF	1102-60 60 Προσδιορισμοί
REF	1102 100 Προσδιορισμοί
REF	1102-120 120 Προσδιορισμοί
REF	1103 200 Προσδιορισμοί
REF	1103-120 120 Προσδιορισμοί
REF	1103-240 240 Προσδιορισμοί
REF	1103-480 480 Προσδιορισμοί
REF	1103-512 512 Προσδιορισμοί
REF	1125 HEp-2 COMVI I νεφρό ποντικών 100 Προσδιορισμοί
REF	1134 HEp-2 COMVI II νεφρό ποντικών 100 Προσδιορισμοί

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Αναλύσεις αντισωμάτων έμμεσου ανοσοφθορισμού (IF), για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) [REF] (1102, 1102-120, 1103, 1103-480, 1103-512, 1102-60, 1103-120, 1103-240, 1125, 1134) αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων (AMA), αντισωμάτων κατά των λείων μυϊκών ινών (ASMA) [REF] (1125, 1134) και αντισωμάτων κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου (AGPA) [REF] (1134) σε ορό ανθρώπου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Τα **αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)** που ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό, συμβάλλουν στη διάγνωση διαταραχών του συνδετικού ιστού, στις οποίες περιλαμβάνονται ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ), η μικτή νόσος του συνδετικού ιστού, το σύνδρομο Sjögren και η σκληροδερμία¹⁻⁵. Τα αντισώματα ANA εμφανίζονται στο 95% των ασθενών με ΣΕΛ, καθώς επίσης και σε ασθενείς με άλλες νόσους του συνδετικού ιστού. Τα ANA ενδέχεται επίσης να εμφανιστούν και σε άλλες διαταραχές, όπως η χρόνια ενεργός ηπατίτιδα και η πρωτοπαθής χολική κίρρωση⁶⁻⁸.

Τα **αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA)** εμφανίζονται σε ποσοστό άνω του 90% των περιπτώσεων πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης, στο 3-11% των ασθενών με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα ενώ απουσιάζουν σε ασθενείς με εξωηπατική απόφραξη χοληφόρων και άλλες νόσους του ήπατος. Η καθολική παρουσία αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση και η ουσιαστική απουσία τους στον εξωηπατικό ίκτερο, καθιστά την ανίχνευση ιδιαίτερα πολύτιμη για τη διαφορική διάγνωση⁶⁻¹².

Υψηλό τίτλο **αντισωμάτων κατά των λείων μυϊκών ινών (ASMA)** (>160) εμφανίζονται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων χρόνιας ενεργού ηπατίτιδας, ενώ μετρίου βαθμού τίτλοι (40-80) εμφανίζονται στην οξεία ιογενή ηπατίτιδα. Περιστασιακά, ενδέχεται να εμφανιστούν σε περιπτώσεις πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης, όπου επίσης ανευρίσκονται σε τίτλους μετρίου βαθμού. Η αξία των τίτλων 20-40 είναι αμφίβολη, καθώς αυτοί οι τίτλοι ενδέχεται να εμφανιστούν σε φυσιολογικά άτομα^{13,14}.

Τα **αντισώματα κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου (AGPA)** σχετίζονται συνήθως με κακοήγη αναιμία και χρόνια ατροφική γαστρίτιδα, στις οποίες εμφανίζονται σε ποσοστό 90% και 50% των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Ωστόσο, δεν είναι ειδικά για τη νόσο αφού ενδέχεται να εμφανιστούν με χαμηλή συχνότητα και σε άλλες διαταραχές. Αν και τα υγιή άτομα ενδέχεται να φέρουν αντισώματα κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου, το εύρημα αυτό πιθανόν να υποδηλώνει ασυμπτωματική ατροφική γαστρίτιδα. Η απουσία αντισωμάτων κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου αποτελεί ισχυρή ένδειξη για τον αποκλεισμό της κακοήθους αναιμίας¹⁵⁻¹⁷.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Στη μέθοδο έμμεσου ανοσοφθορισμού που χρησιμοποιείται σε αυτό το kit, οι οροί των ασθενών επωάζονται σε ένα συνδυασμό υποστρωμάτων (κύτταρα HEp-2 ή κύτταρα HEp-2 και τομές νεφρού/στομάχου ποντικού) προκειμένου να επιτευχθεί δέσμευση των αντισωμάτων. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύονται απομακρύνονται με έκπλυση. Τα αντισώματα τάξης IgG που έχουν δεσμευθεί ανιχνεύονται με την επώαση του υποστρώματος με συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης IgG σηματοδοτημένο με φλουορεσκίνη. Οι αντιδράσεις παρακολουθούνται με μικροσκόπιο φθορισμού που διαθέτει τα κατάλληλα φίλτρα. Η παρουσία ANA, ASMA, AMA και AGPA διαπιστώνεται με την παρουσία φθορισμού έντονου πράσινου χρώματος, σε συγκεκριμένες ιστολογικές δομές του ιστού. Στη συνέχεια, καθορίζονται οι τίτλοι (το αντίστροφο της υψηλότερης αραιώσεως που έδωσε θετική αντίδραση) με ανάλυση διαδοχικών αραιώσεων¹⁸.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια φυλάσσονται στους 2-8°C. Τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα για χρήση, εφόσον φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Υλικά που παρέχονται

Κύτταρα HEp-2 [REF] 1103-120, 1103-240, 1102-60, 1102, 1102-120, 1103, 1103-480, 1103-512

HEp-2/νεφρό ποντικών COMVI I [REF] 1125

HEp-2/νεφρών στομάχου ποντικού COMVI II [REF] 1134

Υπόστρωμα HEp-2

[SORB/SLD]6
[SORB/SLD]10

Αντικειμενοφόροι υποστρώματος HEp-2 με 6 κυψελίδες (20x [REF]1102-120)
Αντικειμενοφόροι υποστρώματος HEp-2 με 10 κυψελίδες (10x [REF]1102, 6x [REF]1102-60,
10x [REF]1103)

[SORB/SLD]12

Αντικειμενοφόροι υποστρώματος HEp-2 με 12 κυψελίδες (10x [REF]1103-120, 20x
[REF]1103-240, 40x [REF]1103-480)

[SORB/SLD]16

Αντικειμενοφόροι υποστρώματος HEp-2 με 16 κυψελίδες (32x [REF]1103-512)

Υπόστρωμα HEp-2/νεφρού ποντικού
Υπόστρωμα

[SORB/SLD]10
[SORB/SLD]10

Αντικειμενοφόροι υποστρώματος HEp-2/νεφρού ποντικού με 10 κυψελίδες (10x [REF] 1125)
Αντικειμενοφόροι

EL			υποστρώματος HEp-2/νεφρού στομάχου ποντικού με 10 κυψελίδες (10x [REF] 1134)
HEp-2/νεφρού στομάχου ποντικού			Διάλυμα θετικού ελέγχου για ANA. Περιέχει ανθρώπινο ορό.
1x 0.5 ml	[CONTROL+ANA]*		Διάλυμα θετικού ελέγχου για AMA. Περιέχει ανθρώπινο ορό. ([REF] 1125, 1134)
1x 0.5 ml	[CONTROL+AMA]*		Διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Περιέχει ανθρώπινο ορό.
1x 0.5 ml	[CONTROL-]*		Συζευκτικό αντίσωμα FITC κατά της ανθρώπινης IgG που περιέχει επίχρωση Evan's blue. Να προστατεύεται από το φως. (1x [REF] 1102-60, 2x [REF] 1102, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 3x [REF] 1103, 1103-240, 6x [REF] 1103-480, 1103-512)
5 ml	[IgG-CONJ FITC EB]*		Αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα. (1x [REF] 1102, 1102-60, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 2x [REF] 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
60 ml	[BUF]*		Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Διαλύστε κάθε φιαλίδιο σε όγκο 1 λίτρου αποσταγμένου ή απιονισμένου νερού. (2x [REF] 1102, 1102-60, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 3x [REF] 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
Vial	[BUF WASH]		
5 ml	[MOUNTING MEDIUM]*		Μέσο επικάλυψης. Να μην καταψύχεται. (1x [REF] 1102, 1102-60, 1125, 1134, 2x [REF] 1102-120, 1103, 1103-120, 3x [REF] 1103-240, 4x [REF] 1103-480, 1103-512)
12 ανά κουτί	[COVER SLD]		Καλυπτρίδες. (1x [REF] 1102, 1102-60, 2x [REF] 1102-120, 1103-120, 1103, 3x [REF] 1103-240, 1103-480)
12 ανά κουτί	[COVER SLD LONG]		Καλυπτρίδες μεγάλου μήκους. (1x [REF] 1125, 1134, 3x [REF] 1103-512)
Προαιρετικά συστατικά			
5 ml	[IgG-CONJ FITC EB]*		Συζευκτικό αντίσωμα FITC κατά της ανθρώπινης IgG. Να προστατεύεται από το φως. [REF] 2100.
1 ml	[EVANS]		Επίχρωση Evan's blue. [REF] 2510.
+ANA τύποι (σάνταρ σετ), AMA, ASMA, AGPA έλεγχοι			
* Περιέχει < 0,1% Na ⁺ N ₃			

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

- [LOT] Αριθμός παρτίδας
- [REF] Αριθμός καταλόγου
- [🗓️] Ημερομηνία λήξης
- [🌡️] Θερμοκρασία αποθήκευσης
- [⚠️] Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης
- [IVD] In vitro διαγνωστική χρήση
- [🏭] Κατασκευαστής
- [📦] Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Μικροσκόπιο φθορισμού
- Μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur
- Ορολογικές πιπέτες
- Τρυβλίο χρώσης (π.χ. δοχείο Corlin)
- Μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες (π.χ. 13 x 75 mm) και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- Δοχείο ενός λίτρου
- Φιάλη έκπλυσης
- Απορροφητικά χαρτιά
- Θάλαμος επώασης

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HbsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Όλα τα δείγματα ανθρώπινου ορού και τα προϊόντα ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα, ανεξάρτητα από την προέλευση τους. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹⁹.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μολυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, ξεπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του kit με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc. Μην το

χρησιμοποιείτε μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλου βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση αυτής της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασίες 2-8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, ο ορός θα πρέπει να καταψυχθεί στους -20°C. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μέθοδος ανάλυσης

A. Ανάλυση διαλογής

Οι οροί των ασθενών που πρόκειται να αντιδράσουν σε αντικειμενοφόρους με υπόστρωμα HEp-2 μόνο θα πρέπει να αραιώνονται σε διάλυμα ανάλυσης διαλογής 1:40. Προτείνεται οροί ασθενών που πρόκειται να αντιδράσουν σε αντικειμενοφόρους με υποστρώματα HEp-2/νεφρού ποντικού ή HEp-2/νεφρού στομάχου ποντικού να αραιώνονται σε αναλογία 1:10 και 1:40 για την ανάλυση διαλογής σε αυτά τα υποστρώματα. Σε τομές νεφρού ποντικού και στομάχου, ειδική αντίδραση σε διάλυμα 1:10 ή μεγαλύτερο τίτλο θεωρείται θετική. Σε HEp-2 ειδική αντίδραση σε 1:40 ή μεγαλύτερο τίτλο θεωρείται θετική.

1. Αραιώστε κάθε υπομονετικό ορό 1:10 με αποθηκευμένο Diluent παρεχόμενο (ορός 20 μl + 180 μl Diluent) και/ή 1:40 (10 μl ορού + 390 μl αραιωτικού). Μην αραιώνετε τα διαλύματα θετικού ή αρνητικού ελέγχου. Φυλάξτε τους μη αραιωμένους ορούς για να καθορίσετε τους τίτλους αντισωμάτων, εάν οι αναλύσεις διαλογής βρεθούν θετικές.
2. Αφήστε τις θήκες που περιέχουν τις αντικειμενοφόρους του υποστρώματος επί 10-15 λεπτά, προκειμένου να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρέστε προσεκτικά τις αντικειμενοφόρους χωρίς να αγγίξετε το υπόστρωμα.
3. Σημάνετε τις αντικειμενοφόρους και τοποθετήστε τις σε ένα θάλαμο επώασης που έχετε καλύψει με απορροφητικό χαρτί διαβρεγμένο με νερό ώστε να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση.
4. Αναστρέψτε το σταγονόμετρο και πιέστε το ελαφρά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μl διαλύματος αρνητικού ελέγχου) στην κυψελίδα υπ' αρ. 1. Με τον ίδιο τρόπο, προσθέστε 1 σταγόνα διαλύματος θετικού ελέγχου ANA στην κυψελίδα υπ' αρ. 2. Εάν εφαρμόζεται, προσθέστε 1 σταγόνα διαλύματος θετικού ελέγχου AMA στην κυψελίδα υπ' αρ. 3 (1125, 1134) Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.
5. Χρησιμοποιώντας μια μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur, προσθέστε 1 σταγόνα από τον αραιωμένο ορό του ασθενούς (περίπου 50 μl) στις υπόλοιπες κυψελίδες. Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.
6. Τοποθετήστε το καπάκι στο θάλαμο επώασης και επωάστε τις αντικειμενοφόρους επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εκπλύνετε με περίπου 10 ml PBS χρησιμοποιώντας μια πιπέτα ή εκπλύνετε την αντικειμενοφόρο σε κύπελλο που περιέχει PBS. Μη χρησιμοποιείτε φιάλη έκπλυσης. Μεταφέρετε την αντικειμενοφόρο αμέσως στο δοχείο Corlin και εκπλύνετε επί 10 λεπτά. Επαναλάβετε τη διαδικασία με όλες τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους.
8. Αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους από το δοχείο Corlin. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. Τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο σε θάλαμο επώασης. Αναστρέψτε αμέσως το σταγονόμετρο του συζευκτικού αντισώματος και πιέστε το μαλακά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μl) σε κάθε κυψελίδα.
9. Επαναλάβετε τα βήματα **7 και 8** για κάθε αντικειμενοφόρο.
10. Τοποθετήστε εκ νέου το καπάκι στο θάλαμο επώασης. Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εμβαπίστε την σε ένα κύπελλο με PBS για να αφαιρέσετε την περίσσεια συζευκτικού αντισώματος. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε ένα δίσκο χρώσης που περιέχει PBS επί 10 λεπτά. Εάν χρησιμοποιηθεί προαιρετικό συζευκτικό αντίσωμα χωρίς επίχρωση (δείτε τα προαιρετικά συστατικά στην ενότητα "Υλικά που παρέχονται"), μπορείτε να προσθέσετε 2-3 σταγόνες επίχρωσης Evans blue στην τελική έκπλυση. Επαναλάβετε για τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τυχόν ακατάλληλη έκπλυση ενδέχεται να προκαλέσει αυξημένο φθορισμό υποβάθρου.
12. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το δίσκο χρώσης. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. **Για να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση της αντικειμενοφόρου, προχωρήστε αμέσως στο επόμενο βήμα, ενόσω η αντικειμενοφόρος είναι ακόμη υγρή.**
13. Εφαρμόστε την καλυπτρίδα, προσθέτοντας **3 σταγόνες** μέσου επικάλυψης ομοιόμορφα επάνω της, και τοποθετήστε την πάνω στην αντικειμενοφόρο. Αποφύγετε την εφαρμογή άσκοπης πίεσης και αποτρέψτε την πλευρική πίεση της καλυπτρίδας.
14. Επαναλάβετε τα βήματα **12 και 13** για κάθε αντικειμενοφόρο.
15. Εξετάστε για ειδικό φθορισμό με μικροσκόπιο φθορισμού σε μεγέθυνση 200x ή μεγαλύτερη.

Οι αντικειμενοφόροι μπορούν να διαβαστούν μόλις προετοιμαστούν. Ωστόσο, εξαιτίας της παρουσίας παράγοντα προστασίας φθορισμού στο μέσο καθήλωσης, δεν εμφανίζεται σημαντική απώλεια της έντασης της χρώσης, εάν η ανάγνωση καθυστερήσει έως και 48 ώρες. Οι αντικειμενοφόροι θα πρέπει να φυλάσσονται σε σκοτεινό χώρο, σε θερμοκρασία 2-8°C.

B. Προσδιορισμός τελικού σημείου (τιτλοδότηση)

Ένας ορός που θα βρεθεί θετικός στην ανάλυση διαλογής μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω, ακολουθώντας τα βήματα 5 έως 13 για τον καθορισμό του τίτλου. Κάθε σειρά ανάλυσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τα διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου. Εκτελέστε διαδοχικές διπλές αραιώσεις ξεκινώντας από την αναλογία 1:10. Ο τίτλος είναι το αντίστροφο της υψηλότερης αραιώσης που έδωσε θετική αντίδραση. Η κατάλληλη αραιώση ανάλυσης διαλογής για το υπόστρωμα (1:10 για HEp-2/νεφρό ποντικού ή HEp-2/νεφρό

στομάχου ποντικού, 1:40 για HEp-2 μόνο).

Προετοιμασία των διαδοχικών αραιώσεων ξεκινώντας από την αναλογία 1:10

Για να δημιουργήσετε διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος ενός ασθενούς από το 1:10 έως το 1:320, ξεκινήστε αριθμώντας έξι σωληνάρια από το 1 έως το 6. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν περισσότερα σωληνάρια εάν επιθυμείται υψηλότερη τελική αραιώση. Προσθέστε 0,9 ml διαλύματος αραιώσης δειγμάτων στο σωληνάριο 1 και 0,2 ml στα σωληνάρια 2 έως 6. Μεταφέρετε με πιπέτα 0,1 ml μη αραιωμένου ορού στο σωληνάριο 1 και αναμίξτε επιμελώς. Μεταφέρετε 0,2 ml από το σωληνάριο 1 στο σωληνάριο 2 και αναμίξτε επιμελώς. Συνεχίστε τη μεταφορά 0,2 ml από το ένα σωληνάριο στο επόμενο μετά από ανάμιξη, προκειμένου να επιτύχετε τις αραιώσεις που απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Σωληνάριο	1	2	3	4	5	6
Ορός	0.1 ml					
	+					
Αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Μεταφορά		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Τελική αραιώση	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 κλττ.
Σωληνάριο	1	2	3	4	5	6
Ορός	0.1 ml					
	+					
Αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα	3.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Μεταφορά		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Τελική αραιώση	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280 κλττ.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κάθε σειρά ανάλυσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τόσο το διάλυμα θετικού όσο και το διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου θα πρέπει να μην παρουσιάζει ειδικό φθορισμό του πυρήνα, των λείων μυϊκών ινών, των νεφρικών σωληναρίων ή των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου. Το διάλυμα θετικού ελέγχου AMA θα πρέπει να παρουσιάζει ένταση φθορισμού των νεφρικών σωληναρίων 2+ ή μεγαλύτερη. Το διάλυμα θετικού ελέγχου ANA θα πρέπει να παρουσιάζει ένταση φθορισμού των πυρήνων 2+ ή μεγαλύτερη, με κυρίως ομοιογενές πρότυπο.

Εάν δεν λάβετε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, θα πρέπει να επαναλάβετε την ανάλυση. Εάν συνεχίζουν να εμφανίζονται ανεπαρκή αποτελέσματα με τα διαλύματα ελέγχου, αυτά ενδέχεται να οφείλονται σε:

- θολερότητα. Απορρίψτε το και χρησιμοποιήστε ένα άλλο διάλυμα ελέγχου.
- Προβλήματα με το οπτικό σύστημα του μικροσκοπίου φθορισμού. Σε αυτά ενδέχεται να συμπεριλαμβάνονται: ακατάλληλη ευθυγράμμιση, παρέλευση της ωφέλιμης διάρκειας ζωής της λυχνίας, κλπ.
- Αποξήρανση της αντικειμενοφόρου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικά, θετικά, ή, εάν ο ειδικός τίτλος τελικού σημείου έχει καθοριστεί, θετικά με τον τίτλο. Σε υποστρώματα νεφρού ποντικού και νεφρού στομάχου ποντικού προτείνεται τα δείγματα των ασθενών που εμφανίζουν ειδικές αντιδράσεις φθορισμού που σχετίζονται με τα αντισώματα ANA, AMA, ASMA και AGPA σε διάλυμα 1:10 να αναφέρονται ως θετικά. Σε υπόστρωμα HEp-2 προτείνεται δείγματα ασθενών που εμφανίζουν ειδικές αντιδράσεις φθορισμού σε διάλυμα 1:40 να αναφέρονται ως θετικά. Αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως οδηγός για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει τις δικές του φυσιολογικές τιμές λόγω διαφορών στα συστήματα των μικροσκόπησης, προσωπικού και εκπαίδευσης.

Διαβάστε μόνο τα πεδία τα οποία εμφανίζουν ειδική χρώση των πυρήνων των κυττάρων του νεφρού και των κυττάρων HEp-2 και το πρότυπο που παρατηρήθηκε για τα ANA, τα νεφρικά σωληνάρια για τα AMA, τα τοιχώματα των νεφρικών αγγείων για τα ASMA και τα τοιχωματικά κύτταρα του στομάχου μόνο για τα AGPA. Όλες οι άλλες αντιδράσεις θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικές για ANA, AMA, ASMA και/ή AGPA.

Τα αντισώματα ANA μπορούν να ανιχνευθούν σε όλα τα υποστρώματα, αλλά θα πρέπει να ποσοτικοποιούνται για το νεφρό ή τα κύτταρα HEp-2. Στα πρότυπα χρώσης του πυρήνα που παρατηρούνται με το νεφρικό υπόστρωμα ή με τα κύτταρα HEp-2 που παρέχονται, περιλαμβάνονται το ομοιογενές, το περιφερικό (σε δακτύλιο), το στικτό και το πρότυπο του πυρηνίσκου. Το πρότυπο χρώσης του κεντρομεριδίου (το οποίο περιλαμβάνει εικόνες μίτωσης), παρατηρείται ευκολότερα στα κύτταρα HEp-2. Αυτά τα πρότυπα πυρηνικής χρώσης περιγράφονται παρακάτω. Ενδέχεται να αποτελούνται από ένα πρότυπο ή από συνδυασμό πολλών διαφορετικών προτύπων χρώσης. Το τελευταίο οφείλεται σε αντιδράσεις με αρκετά, διαφορετικά πυρηνικά αντιγόνα.

EL

Ομοιογενές: Όλος ο πυρήνας φθορίζει ομοιόμορφα με ένα διάχυτο πρότυπο χρώσης.

Πυρηνικός μεμβρανώδης: Οι πυρηνικοί λεκέδες μεμβρανών ο πιά έντονα ως λεπτό γραμμικό σχέδιο με τη μειωμένη ένταση λε κιάσματος του πυρηνοπλάσματος προς το κέντρο του πυρήνα.

Στικτό: Διακριτικές αδρές ή λεπτές στρογγυλές κηλίδες φθορίζουν σε όλη την έκταση του πυρήνα.

Πυρηνίσκου: Οι πυρηνίσκοι χρωματίζονται ως πολλαπλά στερεά σωμάτια εντός του πυρήνα. Πεπερασμένος αριθμός μεγάλων κηλίδων.

Κεντρομεριδίου: Το αντιδρών αντιγόνο διαχωρίζεται μαζί με τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα στα κύτταρα που βρίσκονται σε μίτωση⁵.

Η ειδικότητα ορισμένων αντισωμάτων τα οποία δίνουν τα παραπάνω πρότυπα χρώσης μπορεί να αναγνωριστεί καλύτερα από αναλύσεις για αντισώματα κατά του nDNA και κατά διαφόρων πυρηνικών αντιγόνων που μπορούν να απομονωθούν. Αυτά ενδέχεται να έχουν διαγνωστική αξία, όπως αναφέρεται στην πίνακα 1, στο τέλος αυτού του εντύπου.

Τα AMA μπορούν να παρατηρηθούν τόσο στα άπω όσο και στα εγγύς νεφρικά σωληνάκια, με εντονότερη τη χρώση στα άπω σωληνάκια. Παρόλο που χρωματίζεται και το κυτταρόπλασμα των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου, τα AMA θα πρέπει να ποσοτικοποιούνται στο νεφρό.

Μπορεί επίσης να παρατηρηθεί χρώση του μυϊκού χιτώνα του στομάχου και των νεφρικών σπειραμάτων με ASMA. αλλά θα πρέπει να αναφέρονται μόνο τα ASMA που ανευρίσκονται στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων του νεφρού.

Στα κύτταρα HEp-2, τα κυτταροπλασματικά αντισώματα που μπορούν να ανιχνευθούν περιλαμβάνουν τα αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA) και τα αντισώματα κατά των λείων μυϊκών ινών (ASMA). Σε ένα πρότυπο AMA, το κυτταρόπλασμα εμφανίζεται κοκκιώδες, ενώ το πρότυπο ASMA εμφανίζει ένα ινικό δίκτυο χρώσης σε ολόκληρη την έκταση του κυτταροπλάσματος. Και τα δύο πρότυπα θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικά για ANA. Το AGPA αντιδρά μόνο με τα τοιχωματικά κύτταρα του στομάχου και προκαλεί κυτταροπλασματικές αντιδράσεις. Οι αρνητικές αντιδράσεις στο νεφρό με θετικές αντιδράσεις στο στόμαχο είναι ενδεικτικές των αντισωμάτων AGPA.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οροί θετικοί για ANA ενδέχεται να εμφανιστούν πολύ ασθενείς ή αρνητικοί στην αρχική αραιώση διαλογής (φαινόμενο προζώνης). Σε τέτοιες αμφίβολες περιπτώσεις, οι οροί θα πρέπει να εξετάζονται σε μεγαλύτερες αραιώσεις, και εάν βρεθούν θετικοί, να καθορίζονται οι τίτλοι των αντισωμάτων.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η παρουσία δύο ή περισσότερων αντισωμάτων σε έναν ορό, τα οποία αντιδρούν με το ίδιο υπόστρωμα, ενδέχεται να επηρεάζει την ανίχνευση τους με ανοσοφθορισμό. Αυτή η επίδραση ενδέχεται να προκαλέσει είτε αδυναμία ανίχνευσης ANA είτε μείωση του τίτλου εάν το αντίσωμα που επιδρά έχει μεγαλύτερο τίτλο από το ANA. Όλες οι αντιδράσεις ANA θα πρέπει να αναφέρονται.

Το συζευκτικό αντίσωμα αιγός FITC κατά της ανθρώπινης IgG που παρέχεται σε αυτό το κιτ είναι κατά κύριο λόγο ειδικό για τις βαριές αλυσίδες, αλλά εμφανίζει κάποια δραστηριότητα και κατά των ελαφριών αλυσίδων. Αντιδρά κυρίως με τα αυτοαντισώματα τάξης IgG, αλλά ενδέχεται να αλληλεπιδρά, σε μικρότερο βαθμό, με τις ελαφριές αλυσίδες άλλων τάξεων, όπως η IgM.

Ένα θετικό αποτέλεσμα για αντισώματα ANA δεν θα πρέπει, από μόνο του, να θεωρείται διαγνωστικό για ΣΕΛ. Τα αντισώματα εμφανίζονται και σε ασθενείς με άλλες παθήσεις του συνδετικού ιστού, ενώ ορισμένα φάρμακα όπως η προκαΐναμιδη και η υδραλαζίνη ενδέχεται να επάγουν ένα θετικό αποτέλεσμα ANA¹. Επιπλέον, οροί ασθενών με κακοήθειες και λοιμώδεις νόσους ενδέχεται να έχουν θετικό αποτέλεσμα ANA²⁰.

Ο κλινικός ιατρός θα πρέπει να εξετάσει τα αποτελέσματα όλων των θετικών αναλύσεων έμμεσου ανοσοφθορισμού, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα άλλων εργαστηριακών εξετάσεων και την κλινική κατάσταση του ασθενούς, προκειμένου να καταλήξει σε διάγνωση.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Όπως φαίνεται στους πίνακες 2, 3, 4 και 6 στο τέλος αυτού του εντύπου, οι αναλύσεις για αντιπυρηνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται ως μέθοδος ανίχνευσης του ΣΕΛ και ορισμένων άλλων ανοσολογικών διαταραχών. Τα αντισώματα AMA εμφανίζονται σε ποσοστό άνω του 90% των περιπτώσεων πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης και στο 3-11% των περιπτώσεων χρόνιας ενεργού ηπατίτιδας. Τα ASMA εμφανίζονται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων χρόνιας ενεργού ηπατίτιδας, ενώ τα AGPA σχετίζονται συνήθως με την κακοήγη αναμία και τη χρόνια ατροφική γαστρίτιδα.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Το σύστημα ανάλυσης αυτοαντισωμάτων ImmunoGlo™ συγκρίθηκε με μια άλλη ανάλυση αντισωμάτων με μέθοδο φθορισμού που διατίθεται στο εμπόριο, η οποία χρησιμοποιεί κύτταρα HEp-2 ως υπόστρωμα. Η σύγκριση περιελάμβανε 15 δείγματα ορού από φυσιολογικά άτομα, καθώς και ορούς από ασθενείς με διαγνωσμένο ΣΕΛ, υποξύ δερματικό ερυθηματώδη λύκο, σκληροδερμία ή ρευματοειδή αρθρίτιδα. Οι οροί αναλύθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία και την αραιώση διαλογής που προτείνεται από τον κατασκευαστή. Οι αναλύσεις έδωσαν συγκρίσιμα αποτελέσματα, τα οποία συνοψίζονται παρακάτω:

EL
Σύγκριση kit που χρησιμοποιούν υπόστρωμα κυττάρων HEp-2 για την ανίχνευση αντιπυρηνικών αντισωμάτων

Κλινική κατάσταση	Αριθμός ορών	% θετικά	
		Immco™	Άλλη
ΣΕΛ	12	100	100
Υποξύς δερματικός ερυθματώδης λύκος (SCLÉ)	7	85	85
Σκληροδερμία	6	100	100
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	10	50	30
Φυσιολογικοί μάρτυρες	15	0	0

Το σύστημα ανάλυσης αυτοαντισωμάτων ImmuGlo™ (τομές νεφρού/στομάχου ποντικών) συγκρίθηκε με μια άλλη ανάλυση αντισωμάτων με τη μέθοδο του φθορισμού που διατίθεται στο εμπόριο, η οποία χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα νεφρό/στόμαχο ποντικού. Η σύγκριση περιελάμβανε 20 δείγματα ορού θετικά για ANA, 19 δείγματα ορού θετικά για AMA, 19 δείγματα ορού θετικά για ASMA, 20 δείγματα ορού θετικά για AGPA και 38 δείγματα ορού από φυσιολογικά άτομα. Οι οροί εξετάστηκαν με αρχική αραίωση 1:10, με τη διαδικασία που προτείνεται από τον κατασκευαστή. Οι αναλύσεις έδωσαν συγκρίσιμα αποτελέσματα, τα οποία συνοψίζονται στους πίνακες 7 και 8 στο τέλος αυτού του κειμένου.

DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS

IVD	PROSPECTO
REF 1102-60	60 análisis
REF 1102	100 análisis
REF 1102-120	120 análisis
REF 1103	200 análisis
REF 1103-120	120 análisis
REF 1103-240	240 análisis
REF 1103-480	480 análisis
REF 1103-512	512 análisis
REF 1125 ri riñón del ratón /HEp-2 COMVI I	100 análisis
REF 1134 ri riñón del ratón /HEp-2 COMVI II	100 análisis

USO PREVISTO

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IF) para la detección y cuantificación de anticuerpos antinucleares (ANA) [REF] 1102, 1102-120, 1103, 1103-480, 1103-512, 1102-60, 1103-120, 1103-240, 1125, 1134, antimitocondriales (AMA), anti músculo liso (ASMA) [REF] 1125, 1134 y anti células parietales gástricas (AGPA) [REF] 1134 en suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La detección de anticuerpos antinucleares (ANA) mediante inmunofluorescencia indirecta ayuda en el diagnóstico de enfermedades del tejido conectivo, entre ellas el lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjögren, esclerodermia y otras patologías del tejido conectivo¹⁻⁵. Alrededor del 95% de pacientes con LES es ANA positivo, así como pacientes con otras enfermedades del tejido conectivo. Pueden obtenerse resultados positivos para ANA en otras enfermedades tales como hepatitis activa crónica y cirrosis biliar primaria⁶⁻⁸.

Más del 90% de los casos de cirrosis biliar primaria resultan positivos a los anticuerpos antimitocondriales (AMA), y también del 3 al 11% de los pacientes con hepatitis activa crónica, mientras que no aparecen en pacientes con obstrucción biliar extrahepática y otras enfermedades hepáticas. La presencia universal de anticuerpos antimitocondriales en la cirrosis biliar primaria y su virtual ausencia en la ictericia extrahepática hace que su detección sea de gran valor en la diferenciación de la para el diagnóstico diferencial⁶⁻¹².

Valoraciones altas Títulos elevados (>160) de ASMA (anticuerpos anti musculatura lisa) se presentan en la mayor parte de los casos de hepatitis activa crónica; valoraciones medias títulos medios (40-80) en la hepatitis viral aguda. Ocasionalmente pueden presentarse también en casos de cirrosis biliar primaria, encontrándose también en títulos intermedios medios. La importancia de los títulos valoraciones de 20-40 es dudosa dado que puede presentarse en individuos normales^{13,14}.

Los anticuerpos anti células parietales gástricas (AGPA) se asocian normalmente a la anemia perniciosa y la gastritis crónica atrófica; en efecto, donde se dan en un 90% y 50% de los casos respectivamente. De todos modos, no son específicos de la enfermedad, porque pueden presentarse, aunque con menos frecuencia, en otras enfermedades. La detección de anticuerpos anti células parietales gástricas en individuos sanos podría indicar una gastritis atrófica asintomática. La ausencia de anticuerpos anti células parietales gástricas permite descartar prácticamente una anemia perniciosa¹⁵⁻¹⁷.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

En la técnica IF indirecta utilizada en este kit, el suero del paciente se incuba en diferentes sustratos (células HEp-2 ó HEp-2 y secciones de estómago y riñón de ratón) para el ligado la unión de los anticuerpos. Los anticuerpos que no hayan reaccionado se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos ligados de clase IgG se detectan incubando el sustrato con conjugado de IgG antihumana marcada con fluoresceína. La reacción se observa con en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados. La presencia de ANA, ASMA, AMA y AGPA es denunciada es revelada por una fluorescencia de color verde manzana en estructuras histológicas específicas del tejido. Los títulos (el recíproco de la mayor dilución que provocó una reacción positiva) se determinan analizando las diluciones seriales seriadas¹⁸.

DATOS DEL PRODUCTO

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. Los reactivos están listos para su uso tan pronto como alcanzan la temperatura ambiente.

Material suministrado

Células HEp-2 [REF] 1103-120, 1103-240, 1102-60, 1102, 1102-120, 1103, 1103-480, 1103-512

Células HEp-2 riñón de ratón COMVI I [REF] 1125

HEp-2/estómago y riñón de ratón COMVI II [REF] 1134

Sustrato HEp-2

[SORB] [SLD] [6]

Láminas Porta de sustrato HEp-2 con 6 pocillos (20x [REF] 1102-120)

[SORB] [SLD] [10]

Láminas Porta de sustrato HEp-2 con 10 pocillos (10x [REF] 1102, 6x [REF] 1102-60, 10x [REF] 1103)

[SORB] [SLD] [12]






Láminas Porta de sustrato HEp-2 con 12 pocillos (10x [REF] 1103-120, 20x [REF] 1103-240, 40x [REF] 1103-480)

ES

	SORB SLD 16	Láminas Porta de sustrato HEp-2 con 16 pocillos (32x REF 1103-512)
Sustrato HEp-2 /riñón de ratón	SORB SLD 10	Láminas Porta de sustrato HEp-2/riñón de ratón con 10 pocillos (10x REF 1125)
Sustrato HEp-2 /riñón y estómago de ratón	SORB SLD 10	Láminas Porta de sustrato HEp-2/ riñón y estómago de ratón con 10 pocillos (10x REF 1134)
1 x 0.5 ml	CONTROL + ANA *	Control positivo para ANA. Contiene suero humano.
1 x 0.5 ml	CONTROL + AMA *	Control positivo para AMA. Contiene suero humano. (REF 1125, 1134)
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Control negativo. Contiene suero humano.
5 ml	IgG-CONJ FITC EB *	Conjugado de IgG antihumana FITC que contiene contratinción azul de Evan. Protéjase de la luz. (1x REF 1102-60, 2x REF 1102, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 3x REF 1103, 1103-240, 6x REF 1103-480, 1103-512)
60 ml	BUF *	Diluyente tamponado. (1x REF 1102, 1102-60, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 2x REF 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
Vial	BUF WASH	Tampón fosfato salino (PBS). Disolver cada vial en 1L de agua destilada o desionizada. (2x REF 1102, 1102-60, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 3x REF 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
5 ml	MOUNTING MEDIUM *	Medio de montaje. No congelar. (1x REF 1102, 1102-60, 1125, 1134, 2x REF 1102-120, 1103, 1103-120, 3x REF 1103-240, 4x REF 1103-480, 1103-512)
12 por caja	COVER SLD	Laminillas cubreobjetos. (1x REF 1102, 1102-60, 2x REF 1102-120, 1103-120, 1103, 3x REF 1103-240, 1103-480)
12 por caja	COVER SLD LONG	Laminillas cubreobjetos largas. (1x REF 1125, 1134, 3x REF 1103-512)
Componentes opcionales		
5 ml	IgG-CONJ FITC *	Conjugado de IgG antihumana FITC. Protéjase de la luz. REF 2100.
1 ml	EVANS	Contratinción azul de Evan. REF 2510.

* Control de patrones ANA (set estándar), AMA, ASMA, AGPA

Símbolos empleados en las etiquetas:

- LOT** Número de lote
- REF** Número de catálogo
-  Fecha de caducidad
-  Temperatura de conservación
-  Léanse las instrucciones de uso
- IVD** Para diagnóstico *in vitro*
-  Fabricante
-  Número de análisis

Material necesario no incluido

- Microscopio de fluorescencia
- Micropipetas o pipetas Pasteur
- Pipetas serológicas
- Cubeta de tinción (p.ej. cubeta de Coplin)
- Tubos de ensayo pequeños (p.e. 13 x 75 mm) y gradilla para tubos
- Agua destilada o desionizada
- Recipiente de 1 litro
- Frasco lavador

ES

- Toallas de papel
- Cámara de incubación

ADVERTENCIAS

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Todo material de origen humano usado en la preparación de este producto se ha examinado con métodos aprobados por la FDA, y resultó negativo a anticuerpos contra HIV, HbsAg y HCV. Las muestras de suero humano y los productos de origen humano deben considerarse potencialmente peligrosos independientemente de su origen. Respétense las buenas prácticas de laboratorio al conservar, dispensar y eliminar tales materiales¹⁹.

ATENCIÓN: la azida de sodio (NaN₃) puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías y formar azidas metálicas altamente explosivas. Después de dispensar líquidos, se recomienda lavar con abundante agua para prevenir la formación de dichas azidas. La azida de sodio puede ser tóxica por ingestión; en caso de ingestión accidental, informe inmediatamente del hecho al director del laboratorio o a un centro de control de envenenamientos.

Siga estrictamente las instrucciones tal como se presentan en este prospecto para garantizar resultados válidos. No cambie los componentes del kit con otros de otras fuentes o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc. No los utilice después de la fecha de caducidad.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Este procedimiento requiere suero como muestra. No deben utilizarse muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas con microbios. Conserve las muestras a 2-8°C por no más de una semana. Para una conservación más prolongada, congele el suero a -20°C. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO

Metodología del análisis

A. Control

El suero de los pacientes que va a reaccionar en las láminas porta con sustrato HEp-2 debería diluirse únicamente utilizando dilución de control al 1:40. Se recomienda que el suero del paciente que se reacciona en láminas porta con sustrato HEp-2/riñón de ratón o sustrato HEp-2/riñón y estómago de ratón, se diluyan al 1:10 y 1:40 para detección en dichos sustratos. En secciones de riñón y estómago de ratón, se considera como positiva una reacción específica en una dilución de 1:10 o una titulación mayor. En HEp-2, una reacción específica a 1:40 o una titulación mayor se considera positiva.

1. Diluir el suero del paciente en proporción 1:10 (20 µl de suero + 180 µl de diluyente) y/o 1:40 (10 µl de suero + 390 µl de diluyente). No diluya los controles Positivo o Negativo. Conservar el suero no diluido para determinar la titulación de anticuerpos si los análisis resultaran positivos.
2. Espere a que las bolsas con las láminas los portas de sustrato se estabilicen a la temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraiga las láminas los portas cuidadosamente sin tocar el sustrato.
3. Etiquete las láminas los portas y colóquelas colóquelos en la cámara de incubación acondicionada con toallas de papel humedecidas para mantener las condiciones de humedad adecuadas.
4. Invierta el frasco gotero y aplique suavemente 1 gota (aproximadamente 50 µl) de Control negativo en el pocilio #1. Del mismo modo, aplicar 1 gota de ANA Control positivo en el pocilio #2. Si procede, 1 gota de AMA Control positivo en el pocilio #3 (1125, 1134). No llene demasiado los pocillos.
5. Con una micropipeta o pipeta Pasteur, coloque 1 gota de suero diluido del paciente (aproximadamente 50 µl) en los restantes pocillos. No llene demasiado los pocillos.
6. Coloque la tapa de la cámara de incubación; incube las láminas los portas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Retire una lámina un porta de la cámara de incubación. Sosteniéndola por un extremo, lávela lávelo delicadamente con una pipeta y aproximadamente 10 ml de PBS, o bien en una taza llena recipiente lleno de PBS. No utilice frasco de lavado. Transfiera de inmediato la lámina el porta a una cubeta de Coplin y lávela lávelo durante 10 minutos. Repita el procedimiento con las los restantes láminas los portas.
8. Retire las láminas los portas de la cubeta de Coplin. Seque el borde de las láminas los portas con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Ponga las láminas los portas en la cámara de incubación. Acto seguido, con el frasco gotero de conjugado aplique 1 gota (aproximadamente 50 µl) en cada pocilio.
9. Repita los pasos **7 y 8** para cada lámina porta.
10. Coloque la tapa en la cámara de incubación. Incube 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Extraiga una lámina un porta de la incubadora del incubador. Sosteniéndola Sosteniéndolo por un extremo, sumérjala sumérjalo en un recipiente con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Ponga las láminas los portas en una cubeta de coloración llena de PBS durante 10 minutos. Si decide emplear conjugado sin contrastante contraste (véase Componentes opcionales en el apartado Materiales suministrados) puede añadir 2-3 gotas de contrastante contraste azul de Evans al lavado final. Repita el procedimiento en las láminas los portas restantes. NOTA: un lavado inadecuado podría producir fluorescencia de fondo.
12. Retire una lámina un porta de la cubeta de coloración. Seque el borde con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. **Para evitar que la lámina el porta se seque, pase de inmediato a la fase sucesiva mientras la lámina el porta todavía está húmeda húmedo.**
13. Monte la laminilla el cubre aplicando uniformemente en la misma **3 gotas** de medio de montaje; ponga la laminilla el cubre sobre la lámina el porta sin presionar demasiado y evitando que la laminilla se desplace lateralmente.

ES

14. Repita los pasos 12 y 13 para cada lámina porta.

15. Examine la fluorescencia específica con microscopio de fluorescencia con aumento de 200x o más.

Las láminas Los portas se han de leer tan pronto como estén listas. Sin embargo, gracias a la presencia de un agente antidecoloración en el medio de montaje, no se produce una disminución significativa en la intensidad de coloración aunque la lectura se postergue por 48 horas. Las láminas Los portas deben conservarse en la oscuridad a una temperatura entre 2 y 8°C.

B. Determinación de punto final (titulación)

Un suero que resulte positivo en la fase de control puede ser analizado nuevamente siguiendo los pasos de 5 a 13 para determinar la dilución de control adecuada para el sustrato. (1:10 para HEp-2/riñón de ratón o HEp-2/riñón y estómago de ratón, 1:40 para HEp-2 únicamente). Cada ciclo de análisis incluirá los controles Positivo y Negativo. Prepare diluciones en serie y por duplicado a partir de 1:10. El recíproco de la mayor dilución que provoca una reacción positiva es la titulación.

Preparación de diluciones en serie a partir de 1:10

Para crear diluciones en serie de la muestra de un paciente desde 1:10 hasta 1:320, comience numerando seis tubos del 1 al 6. Pueden ser necesarios más tubos si se desea una dilución final más grande. Ponga 0,9 ml de Diluyente de muestras en el número 1 y 0,2 ml en los tubos de 2 a 6. Pipetee 0,1 ml de suero sin diluir en el tubo 1 y mezcle bien. Transfiera 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezcle bien. Siga transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente después de mezclar hasta producir las diluciones indicadas en la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4	5	6
Suero	0.1 ml					
	+					
Diluyente tamponado	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↗	↗	↗	↗	↗
Transferir	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Dilución final	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

Tubos	1	2	3	4	5	6
Suero	0.1 ml					
	+					
Diluyente tamponado	3.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↗	↗	↗	↗	↗
Transferir	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Dilución final	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280 etc.

CONTROL DE CALIDAD

En cada ciclo de análisis se deben incluir un control positivo y un control negativo. El control negativo no debe evidenciar una fluorescencia específica del núcleo, musculatura lisa, túbulos del riñón o células parietales gástricas. El control positivo AMA debe tener una intensidad de coloración de los túbulos del riñón equivalente a 2+ o superior. El control positivo ANA debe tener una intensidad de coloración del núcleo del riñón de 2+ o superior con un patrón homogéneo predominante.

Si no se obtienen los resultados esperados, hay que repetir el análisis. Si se siguen obteniendo resultados inadecuados con los controles, puede deberse a:

- Turbidez. Descarte el control y utilice otro.
- Problemas en el sistema óptico del microscopio de fluorescencia tales como alineación incorrecta, lámpara que debe ser cambiada, etc.
- La lámina El porta se secó durante el proceso.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados deben considerarse como negativo, positivo, o si se ha determinado titulación de punto final, positivo con titulación. En sustratos de riñón de ratón y sustratos de riñón y estómago de ratón, se recomienda considerar como positivas aquellas muestras de pacientes que muestren reacciones fluorescentes específicas asociadas con ANA, AMA, ASMA y AGPA a una dilución de 1/10. En sustratos HEp-2 se recomienda considerar como positivas aquellas muestras de pacientes que muestren reacciones fluorescentes específicas a una dilución de 1/40. Esto servirá de guía para la interpretación de los resultados. Cada laboratorio debe determinar sus propios valores normales para tener en cuenta las diferencias debidas a los sistemas de microscopios, personal y formación.

Lea únicamente los campos que contienen coloración específica del núcleo de las células del riñón y de las células HEp-2 y el patrón observado para ANA, los túbulos de riñón para AMA, las paredes de los vasos sanguíneos del riñón para ASMA y las células parietales gástricas únicamente para AGPA. Toda otra reacción debe considerarse negativa para ANA, AMA, ASMA o AGPA.

Los ANA pueden detectarse en todos los sustratos, aunque debe cuantificarse en el riñón o las células HEp-2. Los patrones de tinción nuclear que se observan con el sustrato de riñón o con las células HEp-2 incluyen homogénea, periférica (margen), moteada

ES

y nucleolar. El patrón de tinción de los centrómeros (incluyendo las figuras mitóticas) se presenta más fácilmente en las células HEP-2. Estos patrones de tinción nuclear se describen más abajo. Puede ser uno solo o bien una combinación de varios patrones de tinción causada por reacciones ante muchos antígenos nucleares diferentes.

Homogénea: Todo el núcleo adquiere fluorescencia homogénea con patrón de tinción difusa.

Membranoso Nuclear: La membrana nuclear mancha lo más intenso posible como patrón muy bien linear con la intensidad de coloración de disminución del nucleoplasma hacia el centro del núcleo.

Moteada: Manchas discretas, de pequeñas a grandes, adquieren fluorescencia en todo el núcleo.

Nucleolar: Tinción de los nucleolos con motas grandes y gruesas en el núcleo.

Centrómeros: Motas grandes en cantidad limitada. Los antígenos reactivos se separan con cromosomas condensados en células sometidas a mitosis⁵.

La especificidad de algunos de los anticuerpos que producen los patrones de tinción arriba indicados podrá determinarse mediante ensayos de anticuerpos de nADN y varios antígenos nucleares extraíbles; dichos análisis pueden tener importancia diagnóstica, tal como se indica en la Tabla 1 al final de este documento.

Los AMA pueden observarse tanto en los túbulos distales como proximales del riñón, con los túbulos distales de color más brillante. Aunque también se tiñe el citoplasma de las células parietales gástricas, los AMA deben cuantificarse en el riñón.

La tinción de los músculos estomacales y glomérulos del riñón se observa también con ASMA, pero se registrarán únicamente los ASMA detectados en las paredes de los vasos sanguíneos del riñón.

En las células HEP-2, los anticuerpos citoplasmáticos detectables incluyen anticuerpos antimitocondriales (AMA) y anticuerpos anti músculo liso (ASMA). En un patrón AMA, el citoplasma se presenta granulado, mientras que el patrón ASMA es una red fibrilar de tinción en todo el citoplasma. Ambos patrones deben considerarse negativos para ANA. Los AGPA reaccionan únicamente en las células parietales del estómago y producen reacciones citoplásmicas. Reacciones negativas en riñón con reacciones positivas en estómago indican AGPA.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En algunos casos, un suero positivo a ANA puede resultar muy débil o negativo en el control inicial de dilución (fenómeno prozona). En estos casos dudosos, el suero debe ser sometido a control en diluciones más altas; si resultara positivo, se determinarán los títulos del anticuerpo.

En algunos casos, la presencia en un suero de dos o más anticuerpos que reaccionan con el mismo sustrato puede provocar interferencias en la detección mediante inmunofluorescencia. Esta interferencia podría impedir la detección de los ANA o la supresión de su título si el anticuerpo interferente tiene un título superior al de ANA. Todas las reacciones ANA deben ser registradas.

El conjugado de IgG de cabra antihumana con FITC contenido en este kit es principalmente específico para cadena pesada, pero tiene una cierta actividad de cadena ligera. Reacciona ante todo con autoanticuerpos de clase IgG pero, en un nivel menor, puede reaccionar con cadenas ligeras de otras clases tales como IgM.

Un análisis ANA positivo no puede considerarse, por sí solo, como diagnóstico de LES. Se obtienen resultados positivos también en pacientes afectados por otras enfermedades del tejido conectivo; algunos medicamentos como la procainamida y la hidralazina pueden provocar un resultado ANA positivo¹. Es más, el suero de pacientes con afecciones malignas y enfermedades infecciosas puede resultar positivo a ANA²⁰.

Antes de formular su diagnóstico, el médico clínico debe ponderar los resultados de todos los análisis de Inmunofluorescencia indirecta positivos junto con los resultados de otros análisis de laboratorio y las condiciones clínicas del paciente.

VALORES ESPERADOS

Como puede verse en las tablas 2, 3, 4 y 6 al final de este documento, los análisis de detección de anticuerpos nucleares se usan en el control del LES y de algunos otros trastornos inmunológicos. Más del 90% de los casos de cirrosis biliar primaria son positivos a AMA, así como del 3 al 11% de los casos de hepatitis crónica. La mayor parte de los casos de hepatitis activa crónica son positivos a ASMA, mientras que los AGPA están asociados comúnmente a la anemia perniciosa y la gastritis atrófica crónica.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El sistema de detección de autoanticuerpos ImmuGlo™ se comparó con otro ensayo fluorescente de anticuerpos presente en el mercado utilizando como sustrato células HEP-2. Para la comparación se utilizaron 15 muestras de suero de pacientes sanos, así como suero de pacientes con LES diagnosticado, lupus eritematoso cutáneo subagudo, esclerodermia o artritis reumatoide. El suero se analizó siguiendo el procedimiento y la dilución de control indicados por el fabricante. Los resultados obtenidos se comparan a continuación:

Comparación de kits que utilizan sustrato de células HEP-2 para la detección de anticuerpos antinucleares

Estado clínico	No. de suero	% Positivo	
		Immco™	Otro
LES	12	100	100
LE cutáneo subagudo	7	85	85
Esclerodermia	6	100	100
Artritis reumatoide	10	50	30
Controlesnormales	15	0	0

El sistema de detección de autoanticuerpos ImmuGlo™ (secciones de riñón y estómago de ratón) se comparó con otro ensayo de anticuerpos fluorescente disponible en comercio utilizando riñón y estómago de ratón como sustrato. Para la comparación se utilizaron 20 muestras de suero positivo a ANA, 19 muestras de suero positivo a AMA, 19 muestras de suero positivo a ASMA, 20 muestras de suero positivo a AGPA y 38 muestras de suero de pacientes sanos. El suero se analizó a partir de una dilución de 1:10 siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 7 y 8 al final de este documento.



TESTSYSTEM FÜR AUTOANTIKÖRPER

IVD	BEIPACKTEXT
REF	1102-60 60 Bestimmungen
REF	1102 100 Bestimmungen
REF	1102-120 120 Bestimmungen
REF	1103 200 Bestimmungen
REF	1103-120 120 Bestimmungen
REF	1103-240 240 Bestimmungen
REF	1103-480 480 Bestimmungen
REF	1103-512 512 Bestimmungen
REF	1125 Maus niere HEp-2 COMVI I 100 Bestimmungen
REF	1134 Maus niere magen HEp-2 COMVI I 100 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest (IF) für den Nachweis und die quantitative Bestimmung von antinukleären Antikörpern (ANA) [REF] 1102, 1102-120, 1103, 1103-480, 1103-512, 1102-60, 1103-120, 1103-240, 1125, 1134 antimitochondrialen Antikörpern (AMA), Antikörpern gegen glatte Muskulatur (ASMA) [REF] 1125, 1134 und Antikörpern gegen Magenparietalzellen (AGPA) [REF] 1134 in Human serum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesene **antinukleäre Antikörper (ANA)** helfen bei der Diagnose von Bindegewebskrankheiten, zu denen systemischer Lupus erythematoses (SLE), Mischkollagenose, Sjögren-Syndrom und Sklerodermie zählen¹⁻⁵. ANA treten bei etwa 95% von SLE-Patienten sowie bei Patienten mit anderen Bindegeweberkrankungen auf. ANA können auch bei anderen Krankheiten auftreten, z.B. bei chronischer aktiver Hepatitis und primärer biliärer Zirrhose⁶⁻⁸.

Antimitochondriale Antikörper (AMA) treten in über 90% der Fälle von primärer biliärer Zirrhose und bei 3-11% der Patienten mit chronischer aktiver Hepatitis auf; bei Patienten mit extrahepatischer Gallengangsobstruktion und anderen Lebererkrankungen sind sie nicht vorhanden. Aufgrund des durchgängigen Vorhandenseins von antimitochondrialen Antikörpern bei primärer biliärer Zirrhose und ihres faktischen Nichtvorhandenseins bei extrahepatischem Ikterus ist ihr Nachweis von erheblichem Wert für die Differenzialdiagnose⁶⁻¹².

Antikörper gegen glatte Muskulatur (ASMA) treten in den meisten Fällen von chronischer aktiver Hepatitis mit einem hohem Titer (>160) und bei akuter viraler Hepatitis mit einem mittleren Titer (40-80) auf. Sie können gelegentlich in Fällen von primärer biliärer Zirrhose auftreten, wo sie ebenfalls mit mittleren Titern vorkommen. Die Bedeutung von Titern zwischen 20 und 40 ist zweifelhaft, da diese Titer auch bei normalen Personen auftreten können^{13,14}.

Antikörper gegen Magenparietalzellen (AGPA) werden häufig mit perniziöser Anämie und chronischer atrophischer Gastritis in Verbindung gebracht, bei denen sie in 90% bzw. 50% aller Fälle auftreten. Sie sind jedoch nicht krankheitsspezifisch, da sie mit geringer Häufigkeit bei anderen Krankheiten auftreten können. Obwohl bei gesunden Personen Antikörper gegen Magenparietalzellen vorhanden sein können, kann ein solcher Befund eine asymptomatische atrophische Gastritis anzeigen. Ein negativer Befund für Antikörper gegen Magenparietalzellen liefert einen starken Anhaltspunkt für den Ausschluss von perniziöser Anämie¹⁵⁻¹⁷.

TESTPRINZIP

Bei der in diesem Kit verwendeten indirekten Immunfluoreszenzmethode werden Patientenserum auf verschiedenen Substraten (HEp-2-Zellen oder HEp-2-Zellen und Schnitte von Mäusenieren/-magen) inkubiert, um die Bindung der Antikörper zu ermöglichen. Nicht gebundene Antikörper werden durch Spülen entfernt. Gebundene Antikörper der Klasse IgG werden durch Inkubieren des Substrats mit Fluorescein-markiertem Anti-human-IgG-Konjugat nachgewiesen. Die Reaktionen werden unter einem Fluoreszenzmikroskop mit den entsprechenden Filtern beobachtet. Das Vorliegen von ANA, ASMA, AMA und AGPA wird durch eine apfelgrüne Fluoreszenz von spezifischen histologischen Strukturen im Gewebe angezeigt. Die Titer (der Kehrwert der höchsten Verdünnung, die zu einer positiven Reaktion führt) werden anschließend durch das Testen von Verdünnungsreihen bestimmt¹⁸.

PRODUKTINFORMATION Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig, nachdem sie Raumtemperatur erreicht haben.

Mittelieferte Materialien

HEp-2-Zellen [REF] 1103-120, 1103-240, 1102-60, 1102, 1102-120, 1103, 1103-480, 1103-512

HEp-2-Mausniere/COMVI I [REF] 1125

HEp-2/Mausniere/-magen/COMVI II [REF] 1134

HEp-2 Substrat	[SORB SLD 6]	6 HEp-2 Substrat-Objekträger (20x [REF] 1102-120)
	[SORB SLD 10]	10 HEp-2 Substrat-Objekträger (10x [REF] 1102, 6x [REF] 1102-60, 10x [REF] 1103)
	[SORB SLD 12]	12 HEp-2 Substrate-Objekträger (10x [REF] 1103-120, 20x [REF] 1103-240, 40x [REF] 1103-480)
	[SORB SLD 16]	16 HEp-2 Substrat-Objekträger (32x [REF] 1103-512)
HEp-2/Mausnieren/-magen Substrat	[SORB SLD 10]	10 HEp-2/Mausnieren/-magen Substrat (10x [REF] 1125)






DE		
HEp-2/Mausnieren/-magen Substrat	SORB SLD 10	10 HEp-2/Mausnieren/-magen Substrat (10x REF 1134)
1x 0.5 ml	CONTROL + ANA *	ANA positives Kontrollserum. Enthält Humanserum.
1x 0.5 ml	CONTROL + AMA *	AMA positives Kontrollserum. Enthält Humanserum. (REF 1125, 1134)
1x 0.5 ml	CONTROL - *	Negatives Kontrollserum. Enthält Humanserum.
5 ml	IgG-CONJ FITC EB *	Anti-human IgG FITC Konjugat enthält Evans-Blau-Gegenfärbung. Vor Licht schützen. (1x REF 1102-60, 2x REF 1102, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 3x REF 1103, 1103-240, 6x REF 1103-480, 1103-512)
60 ml	BUF *	Gepufferte Verdünnungsmittel. (1x REF 1102, 1102-60, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 2x REF 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
Fläschchen	BUF WASH	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS). Jedes Fläschchen mit 1 L destilliertem oder deionisiertem Wasser auflösen. (2x REF 1102, 1102-60, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 3x REF 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
5 ml	MOUNTING MEDIUM *	Eindeckmittel. Nicht einfrieren. (1x REF 1102, 1102-60, 1125, 1134, 2x REF 1102-120, 1103-120, 1103, 3x REF 1103-240, 4x REF 1103-480, 1103-512)
12 Pro Box	COVER SLD	Deckgläserchen. (1x REF 1102, 1102-60, 2x REF 1102-120, 1103-120, 1103, 3x REF 1103-240, 1103-480)
12 Pro Box	COVER SLD LONG	Lange Deckgläserchen. (1x REF 1125, 1134, 3x REF 1103-512)

Optionale Komponenten

5 ml	IgG-CONJ FITC EB *	Anti-human IgG FITC Konjugat. Vor Licht schützen. REF 2100.
1 ml	EVANS	Evans-Blau-Gegenfärbung. REF 2510.

+ANA Muster (Standard Sets), AMA, ASMA, AGPA Kontrollen

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

LOT	Chargennummer
REF	Bestellnummer
	Verwendbar bis
	Lagerungstemperatur
	Gebrauchsanleitung lesen
IVD	In-vitro-Diagnostikum
	Hersteller
	Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Fluoreszenzmikroskop
- Mikropipette oder Pasteurpipette
- Serologische Pipetten
- Färbekasten (z.B. Coplin-Färbetrog)
- Kleine Teströhrchen (z.B. 13 x 75 mm) und Teströhrchenhalter
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- 1-Liter-Behälter
- Waschflasche
- Papiertücher
- Inkubationskammer

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Alle menschlichen Serumproben und Produkte menschlichen Ursprungs sollten unabhängig von ihrer Herkunft als potentiell gefährlich behandelt werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und

DE

Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹⁹.

WARNUNG – Natriumazid (NaN_3) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer. Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben bei -20 °C eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

VERFAHREN

Testmethode

A. Suchtest

1. Patientenseren, die auf Objektträgern mit Hep-2 Substrat reagieren sollen, sollten mit einer 1:40 Screeninglösung verdünnt werden. Es wird empfohlen, dass Patientenseren, die mit Hep-2/Mausnieren oder Hep-2Mausnieren/-magen Substraten reagieren sollen, sollten 1:10 und 1:40 für Screening an diesen Substraten verdünnt werden. Bei Mausnieren und Mausmagenabschnitten wird eine spezifische Reaktion bei 1:10 Verdünnung oder größerem Titer als positiv angesehen. Verdünnen Sie jedes Patientenserum 1:10 (20 µl Serum + 180 µl Verdünner) und/oder 1:40 (10 µl Serum + 390 µl Verdünner). Verdünnen Sie nicht die positiven und negativen Kontrollseren. Bewahren Sie die unverdünnten Seren auf, um die Antikörpertiter zu bestimmen, falls Suchtests positiv ausfallen.
2. Lassen Sie die Beutel mit den Substratobjektträgern 10-15 Minuten lang bei Raumtemperatur liegen. Entfernen Sie vorsichtig die Objektträger, ohne das Substrat zu berühren.
3. Kennzeichnen Sie die Objektträger und legen Sie sie in eine Inkubationskammer, die mit mit Wasser befeuchteten Papiertüchern ausgelegt ist, um das Austrocknen zu verhindern.
4. Drehen Sie das Tropffläschchen um und drücken Sie es vorsichtig, um 1 Tropfen (etwa 50 µl) negatives Kontrollserum in Vertiefung 1 zu geben. Geben Sie auf gleiche Art 1 Tropfen ANA-positives Kontrollserum in Vertiefung 2. Falls erforderlich, geben Sie 1 Tropfen AMA-positives Kontrollserum in Vertiefung 3 (1125, 1134). Vermeiden Sie das Überfüllen der Vertiefungen.
5. Verwenden Sie einen Mikropipette oder Pasteurpipette, um jeweils 1 Tropfen (etwa 50 µl) des verdünnten Patientenserums in die übrigen Vertiefungen zu geben. Vermeiden Sie das Überfüllen der Vertiefungen.
6. Verschließen Sie die Inkubationskammer und inkubieren Sie die Objektträger 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
7. Entfernen Sie einen Objektträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objektträger am Ende mit dem Etikett an und spülen Sie ihn vorsichtig mit einer Pipette mit etwa 10 ml PBS ab, oder spülen Sie den Objektträger in einem mit PBS gefüllten Becher. Verwenden Sie keine Waschflasche. Geben Sie den Objektträger sofort in einen Coplin-Trog und waschen Sie ihn 10 Minuten lang. Wiederholen Sie diesen Vorgang mit allen anderen Objektträgern.
8. Entfernen Sie den/die Objektträger aus dem Coplin-Trog. Betupfen Sie den Rand des Objektträgers mit einem Papiertuch, um überschüssiges PBS zu entfernen. Legen Sie den Objektträger in die Inkubationskammer. Drehen Sie sofort das Tropffläschchen mit dem Konjugat um und drücken Sie es vorsichtig, um 1 Tropfen (etwa 50 µl) in jede Vertiefung zu geben.
9. Wiederholen Sie Schritte **7 und 8** für jeden Objektträger.
10. Verschließen Sie die Inkubationskammer wieder. Inkubieren Sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
11. Entfernen Sie einen Objektträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objektträger am Ende mit dem Etikett an und tauchen Sie ihn in einen Becher mit PBS, um das überschüssige Konjugat zu entfernen. Belassen Sie den/die Objektträger 10 Minuten lang in einem mit PBS gefüllten Färbekasten. Falls das optionale Konjugat ohne Gegenfärbung verwendet wird (siehe „Optionale Bestandteile“ im Abschnitt „Mitgelieferte Materialien“), können Sie der letzten Spülung 2-3 Tropfen Evans-Blau-Gegenfärbung hinzufügen. Wiederholen Sie den Vorgang mit den übrigen Objektträgern. ANMERKUNG: Unsachgemäßes Waschen kann zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz führen.
12. Entfernen Sie einen Objektträger aus dem Färbekasten. Betupfen Sie den Rand des Objektträgers mit einem Papiertuch, um überschüssiges PBS zu entfernen. **Fahren Sie sofort mit dem nächsten Schritt fort, während der Objektträger noch nass ist, um dessen Austrocknen zu verhindern.**
13. Bringen Sie das Deckgläschen an, indem Sie **3 Tropfen** Eindeckmittel gleichmäßig auf das Deckgläschen auftragen und dieses auf den Objektträger legen. Üben Sie keinen übermäßigen Druck aus und verhindern Sie eine seitliche Bewegung des Deckgläschens.
14. Wiederholen Sie Schritte 12 und 13 für jeden Objektträger.
15. Untersuchen Sie die Objektträger auf eine spezifische Fluoreszenz hin unter einem Fluoreszenzmikroskop bei mindestens 200-facher Vergrößerung.

Die Objektträger können sofort nach ihrer Vorbereitung abgelesen werden. Da das Eindeckmittel jedoch ein Mittel gegen das Verbleichen enthält, tritt kein signifikanter Verlust der Farbintensität ein, wenn das Ablesen um bis zu 48 Stunden verzögert wird. Die Objektträger sollten im Dunkeln bei 2-8 °C gelagert werden.

B. Endpunkt-Bestimmung (Titration)

Sie können ein im Suchtest positives Serum weiter testen, indem Sie Schritte 5 bis 13 befolgen, um den Titer für die richtige Screeninglösung für das Substrat (1:10 für Hep-2/Mausnieren oder Hep-2/Mausnieren/-magen, 1:40 für Hep-2 alleine) zu bestimmen. Bei jedem Testlauf sollten die positiven und negativen Kontrollseren mitverwendet werden. Stellen Sie beginnend mit 1:10. Der Kehrwert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion hervorruft, entspricht dem Titer.

Vorbereitung der Verdünnungsreihen, mit 1:10 beginnend

Um Serienverdünnungen eines Patientenmusters von 1:10 bis 1:320 herzustellen, beginnen Sie mit der Nummerierung von sechs Röhren von 1 bis 6. Mehr Röhren können benutzt werden, falls eine höhere Endlösung gewünscht wird. Geben Sie 0,9 ml Probenverdünner in Röhren 1 und je 0,2 ml in Röhren 2 bis 6. Pipettieren Sie 0,1 ml unverdünntes Serum in Röhren 1 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie 0,2 ml von Röhren 1 in Röhren 2 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie nach dem Mischen weiterhin jeweils 0,2 ml von einem Röhren ins nächste, um die in der nachfolgenden Tabelle angezeigten Verdünnungen zu erhalten:

Röhren	1	2	3	4	5	6
Serum	0.1 ml					
	+					
Gepufferter Verdünner	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Übertragung	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	
Endverdünnung	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 usw.
Röhren	1	2	3	4	5	6
Serum	0.1 ml					
	+					
Gepufferter Verdünner	3.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Übertragung	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	
Endverdünnung	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280 usw.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf sollten sowohl das positive als auch das negative Kontrollserum mitverwendet werden. Das negative Kontrollserum sollte keine spezifische Fluoreszenz der Nuklei, glatten Muskulatur, Nierentubuli oder Magenparietalzellen zeigen. Das AMA-positive Kontrollserum sollte eine Farbintensität der Nierentubuli von 2+ oder höher aufweisen. Das ANA-positive Kontrollserum sollte eine Farbintensität der Nierennuklei von 2+ oder höher mit einem überwiegend homogenen Muster aufweisen. Falls die erwarteten Ergebnisse nicht erhalten werden, sollte der Testlauf wiederholt werden. Falls mit den Kontrollseren weiterhin unzureichende Ergebnisse erzielt werden, kann dies folgende Ursachen haben:

- Trübung. Verwerfen Sie das Kontrollserum und verwenden Sie ein anderes.
- Probleme mit dem optischen System des Fluoreszenzmikroskops. Dazu können zählen: falsche Ausrichtung, die Lampe hat ihre Nutzungsdauer überschritten, usw.
- Der Objektträger ist während des Verfahrens ausgetrocknet.

AUSLEGUNG DER ERGEBNISSE

Ergebnisse sollten als negative, positive oder, sollte ein Endpunkt Titer festgestellt worden sein, als positiv mit Titer angegeben werden. Bei Mausnieren- und Magsmagen Substraten wird empfohlen, dass Patientenmuster, die spezifische Fluoreszenzreaktionen mit ANA, AMA, ASMA und AGPA bei einer Verdünnung von 1:10 aufzeigen, als positive angegeben werden. Für HEP-2 Substrate wird empfohlen, dass Patientenmuster, die Fluoreszenzreaktionen bei einer Verdünnung von 1:40 anzeigen, als positive angegeben werden. Das sollte als Richtlinie bei der Auslegung von Ergebnissen dienen. Jedes Labor muss seine eigenen Standardwerte bestimmen, um Unterschieden in mikroskopischen Anlagen, Personal und Schulung gerecht zu werden.

Lesen Sie nur Felder ab, die eine spezifische Färbung der Nierennuklei und der HEP-2-Zellen sowie das für ANA beobachtete Muster, eine spezifische Färbung der Nierentubuli für AMA, der Nierenblutgefäße für ASMA und der Magenparietalzellen für AGPA enthalten. Alle anderen Reaktionen sollten als negativ für ANA, AMA, ASMA und/ oder AGPA gemeldet werden.

ANA können auf allen Substraten nachgewiesen werden, sollten jedoch auf den Nieren oder HEP-2-Zellen quantifiziert werden. Zu den mit dem gelieferten Nierensubstrat oder den HEP-2-Zellen zu beobachtenden nukleären Färbemustern zählen homogene, periphere (am Rand liegende), gefleckte und nukleoläre Muster. Das Centromerfärbemuster (einschließlich mitotischer Figuren) ist auf HEP-2-Zellen am leichtesten zu sehen. Diese nukleären Färbemuster sind unten beschrieben. Sie können aus einem oder einer Verbindung mehrerer Färbemuster bestehen. Letztere sind auf Reaktionen gegen mehrere verschiedene nukleäre Antigene zurückzuführen.

- Homogen:** Der gesamte Nucleus fluoresziert gleichmäßig mit einem diffusen Färbemuster.
- Kernmembran:** Die Kernmembrane befleckt am intensivsten als fein linear es Muster mit abnehmender befleckender Intensität des Zellkernplasmas zur Mitte des Kernes.
- Gefleckt (speckled):** Separate, grobe bis feine runde Flecken im gesamten Nucleus.
- Nukleolär:** Die Nukleoli werden innerhalb des Nucleus als mehrere feste Körper gefärbt.
- Centromermuster:** Große Flecken begrenzter Anzahl. Reaktive Antigene sondern sich in sich teilenden Zellen mit kondensierten Chromosomen ab.

Die Spezifität einiger der Antikörper, die zu den oben genannten Färbemustern führen, kann durch Tests auf Antikörper gegen nDNA und verschiedene extrahierbare nukleäre Antigene noch weiter identifiziert werden. Diese können wie in Tabelle 1 am Ende dieses Dokuments gezeigt von Bedeutung für die Diagnose sein.

AMA können sowohl an den distalen als auch an den proximalen Nierentubuli beobachtet werden, wobei die Färbung an den distalen Tubuli leuchtender ist. Obwohl auch das Zytoplasma der Magenparietalzellen gefärbt wird, sollten AMA auf Nierenschnitten quantifiziert werden.

Eine Färbung des Muskelgewebes des Magens und der Nierenglomeruli kann auch mit ASMA beobachtet werden. Es sollten jedoch nur ASMA gemeldet werden, die an den Wänden der Nierenblutgefäße zu sehen sind.

Zu den auf HEp-2-Zellen nachweisbaren zytoplasmatischen Antikörpern zählen antimitochondriale Antikörper (AMA) und Antikörper gegen glatte Muskulatur (ASMA). In einem AMA-Muster erscheint das Zytoplasma körnig, während das ASMA-Muster ein faseriges Farbnetz im gesamten Zytoplasma ist. Beide Muster sollten als ANA-negativ gemeldet werden. AGPA reagieren nur auf den Magenparietalzellen und verursachen zytoplasmatische Reaktionen. Negative Reaktionen auf Nierenschnitten mit positiven Reaktionen auf Magenschnitten sind ein Anzeichen für AGPA.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

In einigen Fällen können ANA-positive Seren bei der ersten Suchtestverdünnung entweder sehr schwach oder negativ sein (Prozonenphänomen). In solchen Zweifelsfällen sollten die Seren mit einer höheren Verdünnung getestet werden, und im Fall eines positiven Ergebnisses sollte der Antikörpertiter bestimmt werden.

Das Vorhandensein von zwei oder mehr Antikörpern in einem Serum, die mit demselben Substrat reagieren, kann in einigen Fällen deren Nachweis mittels Immunfluoreszenz beeinträchtigen. Diese Beeinträchtigung kann entweder dazu führen, dass die ANA nicht nachgewiesen werden, oder dass ihr Titer unterdrückt wird, falls der Titer der interferierenden Antikörper höher als der ANA-Titer ist. Alle ANA-Reaktionen sollten gemeldet werden.

Das in diesem Kit enthaltene Anti-human-IgG-FITC-Konjugat aus der Ziege ist hauptsächlich schwerkettenspezifisch. Weist aber auch etwas Leichtkettenaktivität auf. Es reagiert überwiegend mit Autoantikörpern der Klasse IgG, kann jedoch in geringerem Umfang mit den Leichtketten anderer Klassen, z.B. IgM, reagieren.

Ein positiver ANA-Test sollte nicht allein als diagnostisch für SLE angesehen werden. ANA treten auch bei Patienten mit anderen Bindegewebskrankheiten auf, und einige Arzneimittel, z.B. Procainamid und Hydralazin, können positive ANA-Ergebnisse hervorrufen¹. Darüber hinaus können Seren von Patienten mit bösartigen Tumoren oder Infektionskrankheiten ANA-positiv sein²⁰.

Der Arzt sollte bei der Diagnose die Ergebnisse aller positiven indirekten Immunfluoreszenztests zusammen mit den Ergebnissen anderer Labortests und dem klinischen Zustand des Patienten erwägen.

ERWARTETE WERTE

Wie in Tabellen 2, 3, 4 und 6 am Ende dieses Dokuments zu sehen ist, werden Tests auf nukleäre Antikörper als Suchtests für SLE und bestimmte andere immunologische Erkrankungen verwendet. AMA treten in über 90% der Fälle von primärer biliärer Zirrhose und in 3-11% der Fälle von chronischer Hepatitis auf. ASMA treten in den meisten Fällen von chronischer aktiver Hepatitis auf, während AGPA normalerweise mit perniziöser Anämie und chronischer atrophischer Gastritis in Verbindung gebracht werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Das ImmuGlo™ Testsystem für Autoantikörper wurde mit einem anderen im Handel erhältlichen Fluoreszenzantikörpertest mit HEp-2-Zellen als Substrat verglichen. Der Vergleich schloss 15 Serumproben von normalen Testpersonen sowie Seren von Patienten mit SLE, subakutem kutanem Lupus erythematodes, Sklerodermie oder rheumatoider Arthritis ein. Die Seren wurden entsprechend den vom Hersteller empfohlenen Verfahren und Suchtestverdünnungen untersucht. Sie erbrachten vergleichbare Ergebnisse, die nachfolgend zusammengefasst sind:

Vergleich von Kits mit HEp-2-Zellen als Substrat für den Nachweis von antinukleären Antikörpern

Klinische Krankheit	Anzahl der Seren	% Positiv ImmuGlo™	Andere r
SLE	12	100	100
Subakuter kutaner LE (SCLE)	7	85	85
Sklerodermie	6	100	100
Rheumatoide Arthritis	10	50	30
Normale Kontrollseren	15	0	0

Das ImmuGlo™ Testsystem für Autoantikörper (Mausnieren/-magenschnitte) wurde mit einem anderen im Handel erhältlichen Fluoreszenzantikörpertest mit Mausnieren/-magen als Substrat verglichen. Der Vergleich schloss folgende Proben ein: 20 ANA-positive Seren, 19 AMA-positive Seren, 19 ASMA-positive Seren, 20 AGPA-positive Seren und 38 Serumproben von normalen Testpersonen. Die Seren wurden beginnend mit einer Verdünnung von 1:10 mit dem vom Hersteller empfohlenen Verfahren getestet. Sie erbrachten vergleichbare Ergebnisse, die in Tabellen 7 und 8 am Ende dieses Dokuments zusammengefasst sind.



DETECTION DES AUTOANTICORPS

IVD	ENCART DU PRODUIT
REF	1102-60 60 Tests
REF	1102 100 Tests
REF	1102-120 120 Tests
REF	1103 200 Tests
REF	1103-120 120 Tests
REF	1103-240 240 Tests
REF	1103-480 480 Tests
REF	1103-512 512 Tests
REF	1125 Rein de souris HEp-2 COMVI I 100 Tests
REF	1134 Rein estomac de souris HEp-2 COMVI II 100 Tests

Test par immunofluorescence indirecte (IF) pour la recherche et la détermination quantitative des anticorps anti-nucléaires (ANA) [REF] 1102, 1102-120, 1103, 1103-480, 1103-512, 1102-60, 1103-120, 1103-240, 1125, 1134 anticorps anti-mitochondries (AMA), anticorps anti-muscle lisse (ASMA) [REF] 1125, 1134 et anticorps anti-cellule pariétale gastrique (AGPA) [REF] 1134 dans le sérum humain.

GENERALITES

Les Anticorps anti-nucléaires (ANA) détectés par immunofluorescence indirecte sont une aide dans le diagnostic des désordres du tissu conjonctif comprenant le lupus érythémateux disséminé (SLE), le Syndrome de Sjögren, la sclérodermie et les diverses maladies du tissu conjonctif¹⁻⁵. Les ANA se retrouvent chez environ 95% de patients atteints de SLE ainsi que chez les patients présentant d'autres maladies du tissu conjonctif. Les ANA peuvent également se retrouver lors d'autres désordres tels que l'hépatite active chronique et la cirrhose biliaire primaire (PBC)⁶⁻⁸.

Les Anticorps anti-mitochondriaux (AMA) se retrouvent dans plus de 90% de cas de cirrhoses biliaires primaires, chez 3 à 11% des patients ayant une hépatite active chronique et sont absents chez les patients présentant une obstruction biliaire extra-hépatique et dans d'autres affections du foie. La présence des AMA dans tous les cas de PBC et leur absence dans l'ictère extra-hépatique les rend utiles pour la différenciation diagnostique de ces maladies⁶⁻¹².

Les Anticorps anti-muscle lisse (ASMA) se retrouvent en titre élevé (> 160) dans la majorité de cas d'hépatite active chronique et en titre intermédiaire (40-80) dans l'hépatite virale aiguë. De temps en temps ils peuvent se retrouver dans les cas de PBC où ils sont également trouvés dans des titres intermédiaires. La signification des titres de 20-40 est douteuse puisque ces valeurs peuvent se retrouver chez les individus normaux¹³⁻¹⁴.

Les Anticorps anti-cellule pariétale gastrique (AGPA) sont généralement associés à l'anémie pernicieuse et à la gastrite atrophique chronique où ils se retrouvent respectivement dans environ 90% et 50% des cas. Cependant, ils ne sont spécifiques à ces maladies car ils peuvent se retrouver en faible fréquence dans d'autres maladies. Bien que certains individus en bonne santé puissent avoir des AGPA, leur présence peut refléter la gastrite atrophique asymptomatique. Les résultats négatifs pour les AGPA permettent d'exclure la présence d'anémie pernicieuse¹⁵⁻¹⁷.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Dans la méthode à IF indirecte utilisée dans ce kit, les sérums des patients sont incubés sur une diversité de substrats (cellules HEp-2 ou cellules HEp-2 et parties de rein/estomac de souris) pour permettre la liaison des anticorps. Un rinçage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué anti-IgG humaines, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps de classe IgG fixés. Les réactions sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert pomme des structures histologiques spécifiques du tissu montre la présence d'ANA, ASMA, AMA et AGPA. Les titres du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) sont alors déterminés par dilutions successives¹⁸.

INFORMATION PRODUIT

Conservation et préparation des réactifs

Conserver tous les réactifs entre 2° et 8°C. Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Avant utilisation, attendre que les réactifs s'équilibrent à la température ambiante du laboratoire.

Matériel fourni

cellules HEp-2 [REF] 1103-120, 1103-240, 1102-60, 1102, 1102-120, 1103, 1103-480, 1103-512

HEp-2/Rein de souris COMVI I [REF] 1125

HEp-2/Rein- estomac de souris COMVI II [REF] 1134

substrat HEp-2

SORB	SLD	6
SORB	SLD	10
SORB	SLD	12
SORB	SLD	16
SORB	SLD	10

Lame HEp-2 6 puits (20x [REF] 1102-120)

Lame HEp-2 10 puits (10x [REF] 1102, 6x [REF] 1102-60, 10x [REF] 1103)

Lame HEp-2 12 puits (10x [REF] 1103-120, 20x [REF] 1103-240, 40x [REF] 1103-480)

Lame HEp-2 16 puits (32x [REF] 1103-512)

Lame HEp-2/rein de souris 10 puits (10x [REF] 1125)

HEp-2/substrat de rein de souris

HEp-2/substrat de rein-estomac de souris [REF] 1134

1x 0.5 ml

1x 0.5 ml

1x 0.5 ml

5 ml

CONTROL	+	ANA	*
CONTROL	+	AMA	*
CONTROL	-		*
IgG-CONJ		FITC	EB

Lame HEp-2/rein-estomac de souris 10 puits (10x [REF] 1134)

Contrôle positif ANA avec sérum humain.

Contrôle positif AMA avec sérum humain. ([REF] 1125, 1134)

Contrôle négatif avec sérum humain.

Conjugué FITC anti-IgG humaines avec contre-coloration bleu d'Evans. Maintenir à l'abri

FR

		de la lumière. (1x [REF] 1102-60, 2x [REF] 1102, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 3x [REF] 1103, 1103-240, 6x [REF] 1103-480, 1103-512)
60 ml	[BUF]*	Diluant tamponné. (1x [REF] 1102, 1102-60, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 2x [REF] 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
Flacon	[BUF WASH]	Tampon phosphate salin (PBS). Dissoudre chaque flacon dans 1 litre d'eau distillée ou déionisée. (2x [REF] 1102, 1102-60, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 3x [REF] 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
5 ml	[MOUNTING MEDIUM]*	Milieu de montage. Ne pas congeler. (1x [REF] 1102, 1102-60, 1125, 1134, 2x [REF] 1102-120, 1103, 3x [REF] 1103-240, 4x [REF] 1103-480, 1103-512)
12 par boîte	[COVER SLD]	Lamelles couvre-lames. (1x [REF] 1102, 1102-60, 2x [REF] 1102-120, 1103-120, 1103, 1103-120, 3x [REF] 1103-240, 1103-480)
12 par boîte	[COVER SLD LONG]	Longues lamelles couvre-lames. (1x [REF] 1125, 1134, 3x [REF] 1103-512)

Composants en option

5 ml	[IgG-CONJ FITC EB]*	Conjugué FITC anti-IgG humaines. Maintenir à l'abri de la lumière. [REF] 2100.
1 ml	[EVANS]	Contre-coloration bleu d'Evans. [REF] 2510.

*contrôle de la conformation ANA (ensemble standard), AMA, ASMA, AGPA

Symboles utilisés sur les étiquettes :

- [LOT] Numéro de lot
- [REF] Numéro de référence catalogue
- ☞ A utiliser avant
- 🌡 Température de conservation
- ⚠ Lire les instructions d'utilisation
- [IVD] Pour usage diagnostique In vitro
- 🏭 Fabricant
- ▽ Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Microscope à fluorescence Micropipette ou pipette Pasteur Pipettes sérologiques
- Bac à coloration pour le lavage des lames (type Coplin)
- Petits tubes (ex : 13 x 75 mm) et porte tubes
- Eau distillée ou déionisée
- Epruvette graduée 1l
- Flacon pour solution de lavage Serviettes en papier
- Chambre d'incubation

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage¹⁹.

ATTENTION – Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN₃). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit composants par d'autres provenant d'autres fabricants. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Éviter les congélations/décongélations successives des sérums.

MODE OPÉRATOIRE

A. Dépistage

Les sérums des patients qui doivent être testés sur des lames avec substrat HEp-2 uniquement doivent être dilués en utilisant de la dilution de dépistage à 1:40. Il est recommandé que les sérums des patients qui doivent être testés sur des lames avec des substrats HEp-2/rein de souris ou HEp-2/rein-estomac de souris soient dilués à 1:10 et 1:40 pour le dépistage sur ces substrats. Sur les sections de rein et d'estomac de souris, une réaction spécifique à une dilution à 1:10 ou à un titre plus important est considéré comme positive. Sur HEp-2, une réaction spécifique à 1:40 ou à un titre plus important est considérée comme positive.

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:10 (20 µl de sérum + 180 µl de diluant) or 1:40 (10 µl de sérum + 390 µl de diluant). Ne pas diluer les contrôles positifs et/ou négatifs. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des anticorps dans le cas où le dépistage serait positif.
2. Laisser les lames prendre la température du laboratoire pendant 10-15 minutes dans le sachet scellé. Sortir les lames avec précaution sans toucher le substrat
3. Numéroter les lames et les placer dans la chambre humidifiée avec des serviettes en papier mouillées pour éviter le dessèchement.
4. Retourner le flacon doseur et appuyer doucement pour déposer 1 goutte (environ 50 µl) de Contrôle Négatif sur le puits n°1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif ANA sur le puits n°2. Si cela est nécessaire, 1 goutte de contrôle positif AMA sur le puits n°3 (1125, 1134). Eviter de déborder des puits.
5. A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50 µl) de sérum dilué dans les puits restants. Eviter de déborder des puits.
6. Replacer le couvercle sur la chambre et incubé les lames 30 minutes à température ambiante.
7. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette contenant environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un becher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Répéter les opérations avec toutes les lames.
8. Retirer une (les) lame(s) du bac de coloration. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. Déposer la lame dans la chambre d'incubation. Retourner les flacons doseurs de conjugué et déposer immédiatement 1 goutte (environ 50 µl) dans chaque puits.
9. Répéter les étapes **7 et 8** avec chaque lame.
10. Replacer le couvercle sur la chambre d'incubation et incubé 30 minutes à température ambiante.
11. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, plonger la lame dans un becher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration rempli de PBS pendant 10 minutes. Si un supplément de conjugué sans contre-coloration est utilisé (voir composé en option dans la Section Matériel Fourni), 2-3 gouttes de contre-coloration bleue d'Evans peuvent être ajoutée au lavage final. Répéter les opérations avec toutes les lames. REMARQUE : Un lavage incorrect peut altérer la morphologie des neutrophiles et augmenter le bruit de fond de fluorescence.
12. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. **Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est encore humide.**
13. Déposer doucement **3 gouttes** de milieu de montage dans chaque puits et appliquer la lamelle couvre-lame. Ne pas appliquer de pression excessive et éviter les mouvements latéraux de la lamelle.
14. Répéter les étapes **12 et 13** avec chaque lame.
15. Observer la fluorescence spécifique à l'aide d'un microscope au grossissement X200 ou plus.

Les lames peuvent être lues immédiatement. Cependant, grâce à la présence d'un agent anti-fading dans le milieu de montage, la lecture peut être retardée jusqu'à 48 heures sans perte significative de l'intensité de fluorescence. Dans ce cas les lames doivent être conservées à l'obscurité entre 2 et 8°C.

B. Détermination du titre par les dilutions en cascade

Un sérum trouvé positif au test de dépistage doit être retesté en suivant les étapes 5 à 13 afin de définir la dilution de dépistage appropriée pour le substrat (1:10 pour HEp-2/rein de souris ou HEp-2/rein-estomac de souris, 1:40 pour HEp-2 uniquement). Inclure dans chaque nouvelle série un contrôle positif et négatif. Les dilutions en série de 2 en 2 sont réalisées à partir du 1:10. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

Préparation de Dilutions en Série commençant à 1:10

Pour créer des dilutions en série d'un échantillon de patient de 1:10 à 1:320, commencez par numéroter 6 tubes de 1 à 6. Davantage de tubes peuvent être utilisés si une plus grande dilution finale est désirée.

Ajouter 0,9 ml de diluant échantillon dans le tube 1 et 0,2 ml dans les tubes 2 à 6. Pipeter 0,1 ml de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 0,2 ml du tube 1 dans le tube suivant. Continuer à transférer 0,2 ml d'un tube à l'autre en mélangeant bien chaque tube pour arriver aux dilutions suivantes :

Tubes	1	2	3	4	5	6
Sérum	0.1 ml					
	+					
Diluant tamponné	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Transfert		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Dilution finale	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Sérum	0.1 ml					
	+					
Diluant tamponné	3.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Transfert		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Dilution finale	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280 etc.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne doit pas donner d'image fluorescente des noyaux, du muscle lisse, des tubules du rein ou des cellules pariétales gastriques. Avec le contrôle positif AMA on doit obtenir une fluorescence 2+ ou supérieure des tubules du rein. Enfin, avec le contrôle positif ANA, on doit obtenir une fluorescence 2+ ou supérieure des noyaux du rein avec une conformation principalement homogène.

Dans le cas où les contrôles ne donneraient pas les résultats attendus, il est recommandé de refaire le test. Si le problème persiste, cela peut être lié à :

- La turbidité. Eliminer le contrôle et en utiliser un nouveau.
- Au système optique du microscope. Par exemple : mauvais alignement, lampe ayant dépassé sa durée de vie, etc.
- A un assèchement des lames pendant la manipulation. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats des essais pour la recherche des anticorps d'ANA, d'AMA, d'ASMA, et d'AGPA doivent être considérés négatifs (<10) Sur de sections d'estomac de rein (1125, 1134), négatif (<40) Sur les cellules HEp-2 (1102, 1102-60, 1102-120, 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512, 1125, 1134), positifs (avec titre plus grand ou égal à 320) ou, en alternative positifs.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats doivent être considérés comme négatifs, positifs ou, si le titre d'évaluation a été déterminé, positif avec le titre. Sur les substrats de reins de souris et de rein-estomac de souris, il est recommandé que les échantillons de patients démontrant des réactions de fluorescence spécifiques associées avec ANA, AMA, ASMA et AGPA à une dilution de 1 :10 soient considérés comme positifs. Sur les cellules HEP-2, il est recommandé que les échantillons de patients démontrant des réactions de fluorescence spécifiques associées avec ANA, AMA, ASMA et AGPA à une dilution de 1 :40 soient considérés comme positifs. Ceci doit servir de guide à l'interprétation des résultats. Chaque laboratoire est tenu de déterminer ses propres valeurs normales pour prendre en compte les différences de systèmes de microscope, de personnel et de formation.

Ne considérer que les champs comprenant une coloration spécifique des noyaux du rein et des cellules HEp-2 et la conformation observée pour les ANA, les tubules de rein pour les AMA, les parois des vaisseaux sanguins du rein pour les ASMA et les cellules pariétales gastriques uniquement pour les AGPA. Toute autre réaction doit être considérée comme négative pour les ANA, les AMA, les ASMA et/ou les AGPA.

Les ANA peuvent être détectés sur tous les substrats mais devraient être mesurés sur le rein ou les cellules HEp-2. Les conformations de coloration nucléaire observables avec le substrat de rein ou les cellules HEp-2 fournies peuvent résulter homogènes, périphériques (frangées), tachetées et en corpuscules. La conformation de coloration du centromère (Cellules en mitose incluses) est plus facilement visible sur les cellules HEp-2. Ces conformations de coloration nucléaire sont décrites ci-dessous. Elles peuvent être uniques ou constituées par une combinaison de plusieurs conformations de coloration. Ces dernières sont dues aux réactions de plusieurs antigènes nucléaires différents.

FR

- Homogène :** Le noyau entier est régulièrement fluorescent avec une conformation de coloration diffuse.
- Membrané nucléaire :** La membrane nucléaire souille le plus intensément en tant que modèle très bien linéaire avec l'intensité de souillure décroissante du nucléoplasme vers le centre du noyau.
- Tacheté :** Texture grossière et fines taches rondes se colorent dans tout le noyau.
- En corpuscules :** Les nucléoles se colorent comme de multiples éléments dans le noyau.
- Centromère :** Grandes taches de nombre déterminé. Les antigènes ayant réagi s'isolent avec les chromosomes condensés des cellules en mitose.

La spécificité de certains des anticorps donnant les conformations de coloration ci-dessus peut être précisée par des essais pour des anticorps au nDNA et pour divers antigènes nucléaires extractibles. Ceux-ci peuvent être d'importance diagnostique comme énuméré dans la table 1 à la fin de ce document.

On peut observer les AMA sur les tubes distaux et proximaux du rein, les tubes distaux se colorant de façon plus brillante. Bien que le cytoplasme des cellules pariétales gastriques se colore également, les AMA doivent être quantifiés au niveau du rein.

On peut également observer la coloration des muscularis d'estomac et des glomérules du rein avec les ASMA, mais seuls les ASMA observés sur les parois des vaisseaux sanguins du rein doivent être reportés.

Sur les cellules HEp-2, les anticorps cytoplasmiques discernables incluent les anticorps anti-mitochondriaux (AMA) et les anticorps anti-muscle lisse (ASMA). Dans une conformation AMA, le cytoplasme semble granulaire, bien que la conformation ASMA soit un réseau fibrillaire de coloration dans tout le cytoplasme. Les deux conformations doivent être signalées comme négatives pour les ANA. Les AGPA réagissent seulement sur les cellules pariétales de l'estomac et produisent des réactions cytoplasmiques. Des réactions négatives sur le rein et positives sur l'estomac sont indicatives des AGPA.

LIMITES D'UTILISATION

Parfois, un sérum ANA positif peut donner un résultat faiblement positif ou négatif à la dilution de dépistage (effet de zone). Dans ces cas douteux, les sérums devront être testés à des dilutions supérieures et, si le résultat est positif, déterminer le titre des anticorps.

Parfois la présence de deux ou plus anticorps différents dans le sérum et ayant une réactivité vis-à-vis du même substrat, peut créer des interférences pour la détection en immunofluorescence. Cela peut masquer la détection des ANA ou cacher le titre si l'anticorps qui interfère a un titre plus élevé que celui des ANA. Toutes les réactions aux ANA doivent être signalées.

L'appât conjugué anti-IgG FITC humaines fourni dans ce kit est principalement spécifique pour les chaînes lourdes mais a une légère activité chaîne légère. Il réagit principalement avec les anticorps de la classe des IgG mais peut à un degré moindre réagir avec des chaînes légères d'autres classes d'anticorps tels les IgM.

Un ANA positif, de par lui-même, ne doit pas être considéré comme un diagnostic de SLE. Ils se retrouvent également chez les patients présentant d'autres maladies du tissu conjonctif et certaines drogues telles que la procainamide et l'hydralazine peuvent induire un ANA positif¹. D'autre part, les sérums de patients présentant des cancers et des maladies infectieuses peuvent également avoir un ANA positif²⁰.

Lors de son diagnostic, le médecin devrait considérer les résultats de tous les essais positifs d'immunofluorescence indirecte avec les résultats d'autres essais en laboratoire et l'état clinique du patient.

VALEURS PRÉVUES

Comme présenté dans les tableaux 2, 3, 4 et 6 à la fin de ce document, les tests pour la recherche d'anticorps nucléaires sont employés pour détecter le SLE et certains autres problèmes immunologiques. Les AMA se retrouvent dans plus de 90% des cas de cirrhose biliaire primaire et dans 3 à 11% des cas d'hépatite chronique. Les ASMA se retrouvent dans la majorité des cas d'hépatite active chronique et les AGPA sont généralement associés à l'anémie pernicieuse et à la gastrite atrophique chronique.

PERFORMANCES

Le ImmuGlo™ Autoantibody Kit a été comparé à un autre test de détection des anticorps par fluorescence disponible dans le commerce et utilisant les cellules HEp-2 comme substrat. La comparaison comprend 15 échantillons de sérum provenant de sujets en bonne santé ainsi que des sérums de patients présentant un diagnostic de SLE, lupus érythémateux cutané subaigu, de sclérodémie ou d'arthrite rhumatoïde. Les sérums ont été examinés selon les procédés de détection et de dilution recommandés par le fabricant. Ceux-ci ont fournis des résultats comparables récapitulés ci-dessous :

Comparaison de Kits utilisant le substrat cellules Hep-2 pour la détection des anticorps antinucléaires.

État clinique	Nombre de sérums	% Positiv	
		Immco ™	Autre
SLE	12	100	100
SCLE	7	85	85
Sclérodermie	6	100	100
Arthrite rhumatoïde	10	50	30
Contrôles normaux	15	0	0

Le ImmuGio™ Autoantibody Kit (rein/estomac de souris) a été comparé à un autre test de détection des anticorps par fluorescence disponible dans le commerce et utilisant le rein/estomac de souris comme substrat. La comparaison comprend : 20 échantillons de sérums positifs ANA, 19 échantillons de sérums positifs AMA, 19 échantillons de sérums positifs ASMA, 20 échantillons de sérums positifs AGPA et 38 échantillons de sérum provenant de sujets normaux. On a commencé l'analyse des sérums à une dilution 1:10 selon les procédés recommandés par le fabricant. Ceux-ci ont donné des résultats comparables comme récapitulé dans les Tableaux 7 et 8 à la fin de ce document.



TEST DI RILEVAZIONE DI AUTOANTICORPI IN IMMUNOFLUORESCENZA

IVD	INSERTO DEL PRODOTTO
REF	1102-60 60 Determinazioni
REF	1102 100 Determinazioni
REF	1102-120 120 Determinazioni
REF	1103 200 Determinazioni
REF	1103-120 120 Determinazioni
REF	1103-240 240 Determinazioni
REF	1103-480 480 Determinazioni
REF	1103-512 512 Determinazioni
REF	1125 Rene dei mouse HEp-2 COMVI I 100 Determinazioni
REF	1134 Rene/Stomaco dei mouse HEp-2 COMVI II 100 Determinazioni

FINALITA' D'USO

Test di immunofluorescenza indiretta (IF) per l'individuazione e la quantificazione di anticorpi antinucleari (ANA) [REF] 1102-60, 1102, 1102-120, 1103, 1103-120, 1103-480, 1103-512, 1103-240, 1125, 1134, anticorpi antimitocondriali (AMA), anticorpi antimuscolo liscio (ASMA) [REF] 1125, 1134 e di anticorpi anticellule parietali gastriche (AGPA) [REF] 1134 nel siero umano.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE del test

Gli **anticorpi antinucleari (ANA)**, individuati con la tecnica di immunofluorescenza indiretta, sono utili nella diagnosi dei disturbi del tessuto connettivo quali il lupus eritematoso sistemico (LES), la malattia mista del tessuto connettivo, la sindrome di Sjögren e la sclerodermia¹⁻⁵. Gli ANA compaiono in circa il 95% dei pazienti affetti da LES e in pazienti con altri disturbi del tessuto connettivo. Gli ANA possono essere riscontrati anche in caso di altre patologie quali l'epatite cronica attiva e la cirrosi biliare primitiva⁶⁻⁸.

Gli **anticorpi antimitocondriali (AMA)**, sono presenti in circa il 90% dei casi di cirrosi biliare primitiva, nel 3-11% dei pazienti con epatite cronica attiva, mentre sono assenti in pazienti con atresia biliare extraepatica o affetti da altre epatopatie. La presenza universale di anticorpi antimitocondriali in caso di cirrosi biliare primitiva e la virtuale assenza nella colestasi extraepatica, rendono l'identificazione di considerevole valore per la diagnosi differenziale⁶⁻¹².

Gli **anticorpi antimuscolo liscio (ASMA)** in titoli elevati (>160), compaiono nella maggior parte dei casi di epatite cronica attiva e in titoli intermedi (40-80) nei casi di epatite virale acuta. Occasionalmente, possono essere presenti con epatite biliare primitiva anche in titoli intermedi. La significatività dei titoli di 20-40 è incerta dato che questi valori possono essere riscontrati in individui normali¹³⁻¹⁴.

Gli **anticorpi anticellule parietali gastriche (AGPA)** sono comunemente associati con l'anemia perniziosa e la gastrite cronica atrofica, con ricorrenza rispettivamente in circa il 90% e 50% dei casi. Gli AGPA non sono specifici e possono ricorrere con frequenza inferiore in altre patologie. Malgrado gli individui sani possono presentare anticorpi anticellule parietali gastriche, la loro individuazione può riflettere la presenza di gastrite atrofica asintomatica. Esiti negativi della presenza di anticorpi anticellule parietali gastriche forniscono un'evidenza consistente per l'esclusione dell'anemia perniziosa¹⁵⁻¹⁷.

PRINCIPI DELLA METODICA

Il metodo di immunofluorescenza indiretta adottato in questo kit prevede che i sieri dei pazienti possano essere incubati su una varietà di substrati (cellule epiteliali HEp-2 o cellule epiteliali HEp-2 e sezioni di rene/stomaco di topo) per consentire il legame degli anticorpi. Gli anticorpi non legati sono rimossi mediante lavaggio e quelli legati, della classe IgG, sono individuati per incubazione del substrato con coniugato anti-IgG umano marcato con fluoresceina. Le reazioni si osservano per microscopia in fluorescenza usando filtri idonei. La presenza degli ANA, ASMA, AMA e AGPA si manifesta con una fluorescenza verde mela delle strutture istologiche specifiche presenti nel tessuto. I titoli (il valore reciproco della diluizione maggiore che produce una reazione positiva) sono poi determinati analizzando le diluizioni seriali¹⁸.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. E' necessario, prima dell'uso, portare tutti i reagenti a temperatura ambiente

Materiali forniti

Cellule epiteliali HEp-2 [REF] 1103-120, 1103-240, 1102-60, 1102, 1102-120, 1103, 1103-480, 1103-512

HEp-2 rene del mouse COMVI I [REF] 1125

HEp-2/Rene-Stomaco di topo COMVI II [REF] 1134

substrato HEp-2	[SORB SLD 6]	Vetrini da 6 pozzetti con substrato HEp-2 (20x [REF] 1102-120)
	[SORB SLD 10]	Vetrini da 10 pozzetti con substrato HEp-2 (10x [REF] 1102, 6x [REF]1102-60, 10x [REF]1103)
	[SORB SLD 12]	Vetrini da 12 pozzetti con substrato HEp-2 (10x [REF] 1103-120, 20x [REF] 1103-240, 40x [REF]1103-480)
	[SORB SLD 16]	Vetrini da 16 pozzetti con substrato HEp-2 (32x [REF] 1103-512)
HEp-2/substrato	[SORB SLD 10]	Vetrini da 10 pozzetti con substrato HEp-2 /substrato rene di topo (10x [REF] 1125)

IT

rene di topo






HEp-2/substrato rene-stomaco di topo	SORB SLD 10	Vetrini da 10 pozzetti con substrato HEp-2 /substrato rene-stomaco di topo(10x REF 1134)
1 x 0.5 ml	CONTROL + ANA *	Controllo positivo ANA. Contiene siero umano.
1 x 0.5 ml	CONTROL + AMA *	Controllo positivo AMA. Contiene sieroumano. (REF 1125, 1134)
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Controllo Negativo. Contiene siero umano.
5 ml	IgG-CONJ FITC *	Coniugato FITC anti IgG umane con blu di Evans. Proteggere dalla luce. (1x REF 1102-60, 2x REF 1102, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 3x REF 1103, 1103-240, 6x REF 1103-480, 1103-512)
60 ml	BUF *	Diluente tamponato. (1x REF 1102, 1102-60, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 2x REF 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
Fiala	BUF WASH	Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). Sciogliere ogni fiala in 1 litro di acqua distillate o deionizzata. (2x REF 1102, 1102-60, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 3x REF 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
5 ml	MOUNTING MEDIUM *	Liquido di montaggio. Non congelare. (1x REF 1102, 1102-60, 1125, 1134, 2x REF 1102-120, 1103, 1103-120, 3x REF 1103-240, 4x REF 1103-480, 1103-512)
12 per conf.	COVER SLD	Vetrini coprioggetto. (1x REF 1102, 1102-60, 2x REF 1102-120, 1103-120, 1103, 3x REF 1103-240, 1103-480)
12 per conf.	COVER SLD LONG	Vetrini coprioggetto lunghi. (1x REF 1125, 1134, 3x REF 1103-512)

Componenti opzionali

5 ml	IgG-CONJ FITC *	Coniugato FITC anti IgG umane. Proteggere dalla luce. REF 2100.
1 ml	EVANS	Colorante di contrasto Blu di Evans. REF 2510.

* Contiene < 0,1% NaN₃

Simboli usati sulle etichette:

LOT	Numero di lotto
REF	Numero catalogo
	Scadenza
	Temperatura di conservazione
	Leggere le istruzioni per l'uso
IVD	Uso diagnostico in vitro
	Produttore
	Numero di test

Materiali necessari non forniti

- Microscopio a fluorescenza
- Micropipetta o pipetta Pasteur
- Pipette sierologiche
- Vaschetta per colorazione (ad es. vaschetta Coplin)
- Provette piccole pertest (ad es. 13 x 75 mm) e rack per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Contenitore da 1 litro
- Flacone di lavaggio
- Salviette di carta
- Camera umida per l'incubazione

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia i derivati del sangue umano e i campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali¹⁹.

ATTENZIONE – L'azide sodica (NaN₃) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente

IT

esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Non usare oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questa procedura usare unicamente campioni di siero. I campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati a -20°C. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

PROCEDURA

Metodo del test

A. Screening

Far reagire il siero del paziente su vetrini con substrato HEp-2 diluendolo solo usando diluizioni di screening 1:40. Si raccomanda di far reagire il siero del paziente su vetrini con substrati HEp-2/rene topo o HEp-2/stomaco rene topo diluiti a 1:10 e 1:40 per lo screening su questi substrati. Sulle sezioni di rene e di fegato di topo una reazione specifica a una diluizione con titolo 1:10 o superiore è considerata positiva. Su HEp-2 una reazione specifica con titolo 1:40 o superiore è considerata positiva.

1. Diluire il siero del paziente 1:10 (20 µl di siero + 180 µl di diluente) e/o diluire il siero del paziente 1:40 (10 µl di siero + 390 µl di diluente). Non diluire i Controlli Positivi o Negativi. Conservare il siero non diluito per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che le buste contenenti i vetrini raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti. Rimuovere con attenzione il vetrino senza venire in contatto con il substrato.
3. Contrassegnare i vetrini e disporli nella camera umida sul cui piano interno saranno state poste delle salviette di carta inumidite con acqua per prevenire l'essiccazione.
4. Applicare 1 goccia (circa 50 µl) di Controllo Negativo nel pozzetto #1. Allo stesso modo applicare 1 goccia di Controllo Positivo ANA nel pozzetto #2 e, se applicabile, 1 goccia di Controllo Positivo AMA nel pozzetto #3 (1125, 1134). Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Usando una micropipetta o pipetta Pasteur, applicare 1 goccia di siero diluito del paziente (circa 50 µl) negli altri pozzetti. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
6. Posizionare il coperchio sulla camera umida e incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
7. Rimuovere il vetrino dalla camera umida, reggerlo per l'estremità e irrorare delicatamente con circa 10 ml di PBS usando una pipetta, oppure sciacquare il vetrino in un recipiente contenente PBS. Non usare flaconi di lavaggio. Trasferire immediatamente il vetrino in una vaschetta Coplin di lavaggio e attendere per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
8. Rimuovere il/i vetrino/i dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso e collocarlo nella camera umida. Applicarne 1 goccia (circa 50 µl) di Coniugato in ciascun pozzetto.
9. Ripetere le fasi **7 e 8** per ciascun vetrino.
10. Riposizionare il coperchio sulla camera umida e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
11. Rimuovere il vetrino dalla camera umida, reggerlo per l'estremità e immergerlo in un recipiente contenente PBS per rimuovere il coniugato in eccesso. Lasciare il/i vetrino/i per 10 minuti in una vaschetta Coplin riempita con PBS. Nel caso venga usato un coniugato opzionale, privo di colorante di contrasto (vedere componenti opzionali nella sezione Materiali Forniti), possono essere aggiunte 2-3 gocce di Blu di Evans nel lavaggio finale. Ripetere la procedura per i restanti vetrini. **NOTA:** Un lavaggio inadeguato può causare un aumento nella fluorescenza di fondo.
12. Rimuovere il vetrino dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. **Per prevenire l'essiccazione, procedere immediatamente alla fase successiva mentre il vetrino è ancora umido.**
13. Montare il vetrino coprioggetto applicando **3 gocce** di soluzione di montaggio uniformemente sul coprioggetto e posizionarlo sopra il vetrino. Evitare di esercitare una pressione eccessiva e gli spostamenti laterali del vetrino coprioggetto.
14. Ripetere le fasi 12 e 13 per ciascun vetrino.
15. Esaminare la fluorescenza specifica mediante microscopia a fluorescenza con ingrandimento 200x o superiore.

I vetrini possono essere letti appena montati. Tuttavia, per la presenza di un agente antiscolorimento nella soluzione di montaggio, non si verificano perdite significative di intensità di colorazione e la lettura può essere effettuata nelle 48 ore successive alla preparazione. I vetrini devono essere conservati in assenza di luce a 2-8°C.

B. Determinazione Endpoint (titolazione)

Un siero positivo al test di screening può essere analizzato ulteriormente ripetendo le fasi da 5 a 13 per determinare la diluizione appropriata per lo screening del substrato (1:10 per HEp-2/rene topo o HEp-2/stomaco rene topo,

1:40 solo per HEp-2). Ogni serie di test deve includere Controlli Positivi e Negativi. Preparare diluizioni seriali doppie a partire da 1:10. Il reciproco del valore della più alta diluizione eseguita a cui il campione mostra positività è il valore del titolo.

Preparazione delle Diluizioni Seriali a partire da 1:10

"Per creare diluizioni seriali di un campione di un paziente da 1:10 a 1:320, iniziare a numerare sei provette da 1 a 6. Se si desidera una diluizione finale più alta possono essere usate più provette. Aggiungere 0,9 ml di Diluente del Campione nella provetta 1 e 0,2 ml nelle provette da 2 a 6. Pipettare 0,1 ml di siero non diluito nella provetta 1 e mescolare accuratamente. Trasferire 0,2 ml dalla provetta 1 alla provetta 2 e mescolare accuratamente. Continuare a trasferire 0,2 ml da una provetta alla successiva, dopo la miscelazione, per ottenere le diluizioni indicate nella tabella seguente:

Provette	1	2	3	4	5	6
Siero	0.1 ml					
	+					
Diluente tamponato	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Trasferimento	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	
Diluizione finale	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

Provette	1	2	3	4	5	6
Siero	0.1 ml					
	+					
Diluente tamponato	3.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Trasferimento	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	
Diluizione finale	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280 etc.

CONTROLLO DI QUALITÀ

In ogni serie di test dovrebbero essere inclusi un Controllo Positivo e un Controllo Negativo. Il Controllo Negativo non dovrebbe evidenziare fluorescenza specifica dei nuclei, del muscolo liscio, dei tubuli renali o delle cellule parietali gastriche. Il Controllo Positivo AMA dovrebbe produrre una colorazione dei tubuli renali con intensità di 2+ o maggiore. Il Controllo Positivo ANA dovrebbe presentare una colorazione dei nuclei renali con intensità di 2+ o maggiore e un pattern prevalentemente omogeneo.

Se non si ottengono i risultati attesi, la procedura dovrebbe essere ripetuta. Se i controlli continuano a produrre risultati discordanti, ciò può essere dovuto a:

- Torbidità. Smaltire e usare un nuovo controllo.
- Problemi legati al sistema ottico del microscopio a fluorescenza: allineamento non idoneo, lampada oltre la durata utile prevista, ecc.
- Aver lasciato asciugare il vetrino durante la procedura.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dovrebbero essere risultati come negativi, positivi o, se il titolo dell'endpoint è stato determinato, positivi con titolo. Sui substrati di rene del topo e rene-stomaco del topo è raccomandato che i campioni del paziente che mostrano reazioni di fluorescenza specifica associata a ANA, AMA, ASMA e AGPA in una diluizione 1:10 siano riportati come positivi. Sul substrato HEp-2 si raccomanda che i campioni del paziente che mostrano reazioni di fluorescenza specifica una diluizione 1:40 siano riportati come positivi. Ciò deve servire come guida per l'interpretazione dei risultati. Ogni laboratorio deve determinare i suoi propri valori normali che tengano conto delle differenze dei sistemi dei microscopi, del personale e della formazione.

Leggere unicamente, per gli ANA i campi contenenti colorazione specifica dei nuclei renali e delle cellule epiteliali HEp-2 e il pattern osservato, per gli AMA i tubuli renali, per gli ASMA le pareti dei vasi sanguigni renali e per gli AGPA le cellule parietali gastriche. Tutte le altre reazioni per ANA, AMA, ASMA e/o AGPA dovrebbero essere riportate come negative.

Gli ANA possono essere rilevati su tutti i substrati ma dovrebbero essere quantificati sul rene o sulle cellule epiteliali HEp-2. Il pattern di colorazione nucleare osservabile con il substrato renale o con le cellule epiteliali HEp-2 può essere di tipo omogeneo, periferico (bordo), punteggiato e nucleolare. Il pattern di colorazione del centromero (incluse le figure mitotiche) è più evidente sulle cellule epiteliali HEp-2. I pattern di colorazione nucleare possibili sono descritti di seguito e possono manifestarsi in una o più combinazioni come risultato di reazioni a diversi antigeni nucleari.

- Omogeneo:** Fluorescenza uniforme dell'intero nucleo con pattern di colorazione diffuso.
- Membranous nucleare:** La membrana nucleare macchia il più intensamente come modello benissimo lineare con l'intensità di macchiatura diminvente del nucleoplasma verso il centro del nucleo.
- Punteggiato:** Fluorescenza a macchie tondeggianti da granulari a finemente granulari nell'intero nucleo.
- Nucleolare:** I nucleoli si colorano come corpi solidi multipli all'interno del nucleo.
- Centromero:** Macchie larghe di numero finito. L'antigene reattivo è segregato con i cromosomi condensati in cellule in fase mitotica⁵.

La specificità di alcuni degli anticorpi che producono i pattern di colorazione citati possono essere ulteriormente identificati mediante test per gli anticorpi anti-nDNA e per vari antigeni nucleari estraibili, con la significatività diagnostica indicata nella tabella 1 riportata alla fine di questo documento.

Gli AMA possono essere rilevati sia sui tubuli distali che su quelli prossimali del rene con una colorazione che risulta maggiormente brillante sui tubuli distali. Malgrado si ottenga una colorazione del citoplasma delle cellule parietali gastriche, gli AMA dovrebbero essere quantificati sul rene.

Con gli ASMA si può osservare una colorazione della muscolaris mucosae dello stomaco e dei glomeruli renali, ma solo gli ASMA visibili sulle pareti dei vasi sanguigni dovrebbero essere riportati.

Sulle cellule epiteliali HEp-2, gli anticorpi citoplasmici rilevabili includono gli anticorpi antimitocondriali (AMA) e quelli antimuscolo liscio (ASMA). Nel pattern AMA il citoplasma è di aspetto granuloso, mentre il pattern per gli ASMA risulta come una rete fibrillare che colora l'intero citoplasma. Entrambi i pattern dovrebbero essere riportati come negativi per gli ANA. Gli AGPA reagiscono unicamente sulle cellule parietali dello stomaco e generano reazioni citoplasmiche. Reazioni negative su rene e positive su stomaco sono indicative della presenza di AGPA.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

In alcuni casi, i sieri positivi per gli ANA possono essere o molto deboli o negativi alla diluizione iniziale di screening (fenomeno prozona). In questi casi incerti, i sieri dovrebbero essere analizzati a diluizioni maggiori e, se positivi, dovranno essere determinati i titoli anticorpali.

Nel caso in cui in un siero siano presenti due o più anticorpi reattivi con lo stesso substrato, può verificarsi un'interferenza nel rilevamento per immunofluorescenza. L'interferenza può risultare in mancata individuazione degli ANA o in soppressione del titolo se l'anticorpo interferente ha un titolo più alto di quello degli ANA. Tutte le reazioni degli ANA dovrebbero essere riportate.

Il Coniugato FITC anti-IgG umano caprino fornito in questo kit è prevalentemente specifico per le catene pesanti ma presenta anche una certa attività con le catene leggere. Reagisce maggiormente con gli autoanticorpi della classe IgG, ma può, in misura inferiore, reagire con le catene leggere di altre classi, ad esempio le IgM.

Un risultato positivo per gli ANA dovrebbe essere considerato diagnostico di LES. Occorre però considerare che gli ANA sono presenti anche in pazienti con altre malattie del tessuto connettivo e che l'uso di farmaci quali procainamide e idralazina possono indurre risultati ANA¹ positivi. Inoltre, anche i sieri di pazienti con tumori maligni e malattie infettive possono risultare positivi agli ANA²⁰.

Per la formulazione della diagnosi i medici dovrebbero pertanto valutare i risultati positivi dei test di immunofluorescenza indiretta insieme ai risultati di altre analisi di laboratorio e alle condizioni cliniche del paziente.

VALORI ATTESI

Come si può vedere dalle tabelle 2, 3, 4 e 6 riportate alla fine di questo documento, le analisi per gli anticorpi nucleari vengono usate per lo screening di LES e di alcuni altri disturbi immunologici. Gli AMA compaiono in più del 90% dei casi di cirrosi biliare primitiva e nel 3-11% dei casi di epatite cronica. GliASMA sono presenti nella maggior parte dei casi di epatite cronica attiva e gli AGPA sono comunemente associati con l'anemia perniziosa e la gastrite cronica atrofica.

PERFORMANCE DEL TEST

Il Test di Rilevazione di Autoanticorpi in Immunofluorescenza ImmuGlo™ è stato confrontato con un test analogo in fluorescenza disponibile in commercio che usa come substrato cellule epiteliali HEp-2. La comparazione ha incluso 15 campioni di siero da soggetti normali oltre a sieri di pazienti con diagnosi di LES, di lupus eritematoso cutaneo subacuto, scleroderma o artrite reumatoide. I sieri sono stati testati secondo la procedura e le diluizioni di screening consigliate dal produttore.

I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono:

Comparazione di Kit che utilizzano cellule epiteliali HEp-2 come Substrato per l'Individuazione di Anticorpi Antinucleari

Condizione Clinica	N. di Sieri	% Positiva	
		Immco™	Altri
LES	12	100	100
LE Cutaneo Subacuto (LECS)	7	85	85
Scleroderma	6	100	100
Artrite Reumatoide	10	50	30
Controlli Normali	15	0	0

Il Test di Rilevazione di Autoanticorpi in Immunofluorescenza ImmuGlo™ (Sezioni di Rene/Stomaco di topo) è stato confrontato con un altro test in fluorescenza disponibile in commercio che usa come substrato rene/stomaco di topo. La comparazione ha incluso: 20 campioni di siero positivi agli ANA, 19 campioni di siero positivi agli AMA, 19 campioni di siero positivi agli ASMA, 20 campioni di siero positivi agli AGPA e 38 campioni di siero da soggetti normali. I sieri sono stati analizzati a partire da una diluizione 1:10 secondo la procedura consigliata dal produttore. I risultati dei test sono riassunti nelle Tabelle 7 e 8 riportate alla fine del presente documento.



SISTEMA DE TESTE DE AUTO-ANTICORPOS

IVD	FOLHETO DO PRODUTO	
REF	1102-60	60 Determinações
REF	1102	100 Determinações
REF	1102-120	120 Determinações
REF	1103	200 Determinações
REF	1103-120	120 Determinações
REF	1103-240	240 Determinações
REF	1103-480	480 Determinações
REF	1103-512	512 Determinações
REF	1125 Rim de HEp-2/rato COMVI I	100 Determinações
REF	1134 Rim/estômago de HEp-2/rato COMVI II	100 Determinações

APLICAÇÃO

Testes de anticorpos por imunofluorescência (IF) para a detecção e quantificação dos anticorpos anti-nucleares (ANA) [REF] 1102, 1102-120, 1103, 1103-480, 1103-512, 1102-60, 1103-120, 1103-240, 1125, 1134, anticorpos anti-mitochondriais (AMA), anticorpos anti-músculo liso (ASMA) [REF] 1125, 1134 e anticorpos anti-células parietais gástricas (AGPA) [REF] 1134 em soro humano.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os Anticorpos Anti-nucleares (ANA), detectados por imunofluorescência indirecta, auxiliam o diagnóstico de patologias do tecido conjuntivo incluindo Lúpus eritematoso sistémico (LES), doença mista do tecido conjuntivo. Síndrome de Sjögren e esclerodermia¹⁻⁵. Os ANA apresentam-se em cerca de 95% dos doentes LES bem como em doentes com outras doenças do tecido conjuntivo. Os ANA também se podem apresentar noutras patologias tais como hepatite crónica activa e cirrose biliar primária⁶⁻⁸.

Os Anticorpos Anti-mitochondriais (AMA) apresentam-se em mais de 90% dos casos com cirrose biliar primária, em 3 a 11% dos doentes com hepatite crónica activa e estão ausentes nos doentes com obstrução biliar extra-hepática e noutras doenças do fígado. A presença universal de anticorpos anti-mitochondriais na cirrose biliar primária e a sua ausência virtual em icterícia extra-hepática torna a sua detecção de valor considerável no diagnóstico diferencial⁶⁻¹².

Os Anticorpos Anti-músculo liso (ASMA) em alta título (>160) apresentam-se na maioria dos casos de hepatite crónica activa e em títulos intermédios (40-80) em hepatite virai aguda. Ocasionalmente poderão apresentar-se em casos de cirrose biliar primária na qual também se encontram em titulações intermédias. A importância de títulos de 20-40 é ambígua visto que estes títulos podem apresentar-se em indivíduos normais¹³⁻¹⁴.

Os Anticorpos Anti-células parietais gástricas (AGPA) estão normalmente associados a anemia perniciosa e gastrite crónica atrofica nas quais se apresentam em cerca de 90% e 50% dos casos, respectivamente. Todavia, eles não são específicos da doença pois podem apresentar-se com pouca frequência noutras patologias. Apesar de os indivíduos saudáveis poderem ter anticorpos contra as células parietais gástricas, a sua descoberta poderá reflectir uma gastrite atrofica assintomática. A inexistência de anticorpos das células parietais gástricas é uma importante evidência para a exclusão de uma anemia perniciosa¹⁵⁻¹⁷.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

No método de imunofluorescência indirecta usado neste kit, incubam-se os soros do doente em diversos substratos (células HEp-2 ou células HEp-2 e cortes de rim/estômago de murganho) para permitir a ligação dos anticorpos. Quaisquer anticorpos que não se tenham ligado são eliminados por lavagem. Os anticorpos que se ligaram, da classe IgG, são detectados através da incubação do substrato com conjugado de IgG anti-humana marcado com fluoresceína. As reacções são observadas com um microscópio de fluorescência equipado com filtros adequados. A presença de ANA, ASMA, AMA e AGPA é demonstrada por uma fluorescência verde-maçã de estruturas histológicas específicas no tecido. Os títulos (o recíproco da maior diluição que provocou uma reacção positiva) são então determinada testando diluições em série¹⁸.

INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO

Conservação e preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. Os reagentes estão prontos a usar depois de terem estabilizado a temperatura ambiente.

Materiais fornecidos






Substrato HEp-2	[SORB SLD 6] [SORB SLD 10]	Lâminas de substrato com 6 poços HEp-2 (20x [REF]1102-120) Lâminas de substrato com 10 poços HEp-2 (10x [REF]1102, 6x [REF]1102-60, 10x [REF]1103)
	[SORB SLD 12]	Lâminas de substrato com 12 poços HEp-2 (10x [REF]1103-120, 20x [REF]1103-240, 40x [REF]1103-480)
HEp-2/substrato de rim de rato	[SORB SLD 16] [SORB SLD 10]	Lâminas de substrato com 16 poços HEp-2 (32x [REF]1103-512) Lâminas de substrato de rim de 10 poços HEp-2 (10x [REF]1125)
HEp-2/substrato de rim e estômago de rato	[SORB SLD 10]	Lâminas de substrato de rim e estômago de 10 poços HEp-2 (10x [REF]1134)
1x 0.5 ml	[CONTROL + ANA]*	Controlo positivo para ANA. Contém soro humano.
1x 0.5 ml	[CONTROL + AMA]*	Controlo positivo para AMA. Contém soro humano. ([REF]1125, 1134)
1x 0.5 ml	[CONTROL -]*	Controlo negativo. Contém soro humano.
5 ml	[IgG-CONJ FITC EB]*	Conjugador de IgG anti-humana com FITC contendo contracorante azul de Evans. Proteger da luz. (1x [REF]1102-60, 2x [REF]1102, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 3x [REF]1103, 1103-240, 6x [REF]1103-480, 1103-512)
60 ml	[BUF]*	Diluinte tamponado. (1x [REF]1102, 1102-60, 1102-120, 1103-120, 1125, 1134, 2x [REF]1103)

PT

Frasco	BUF WASH	1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512) Tampão fosfato salino (PBS). Dissolver cada frasco em 1L de água destilada ou deionizada. (2x [REF] 1102, 1102-60, 1102-120, 1125, 1134, 3x [REF] 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
5 ml	MOUNTING MEDIUM*	Meio de montagem. Não congelar. (1x [REF] 1102, 1102-60, 1125, 1134, 2x [REF] 1102-120, 1103-120, 1103, 3x [REF] 1103-240, 4x [REF] 1103-480, 1103-512)
12 por caixa	COVER SLD	Lamelas. (1x [REF] 1102, 1102-60, 2x [REF] 1102-120, 1103-120, 1103, 3x [REF] 1103-240, 1103-480)
12 por caixa	COVER SLD LONG	Lamelas compridas. (1x [REF] 1125, 1134, 3x [REF] 1103-512)
Componentes opcionais		
5 ml	IgG-CONJ FITC EB*	Conjugador de IgG anti-humana IgG com FITC. Proteger da luz. [REF] 2100.
1 ml	EVANS	Contracorante azul de Evans. [REF] 2510.

*Modelos +ANA (conjunto padrão), AMA, ASMA, AGPA

Símbolos utilizados nos rótulos:

- LOT** Número de lote
- REF** Número de catálogo
-  Prazo de validade
-  Temperatura de armazenamento
-  Ler as instruções de utilização
- IVD** Utilização em diagnóstico in vitro
-  Fabricante
-  Número de testes

Material necessário mas não fornecido

- Microscópio de fluorescência
- Micropipeta ou pipeta de Pasteur
- Pipetas serológicas
- Recipiente de coloração (ex: Coplin)
- Tubos de ensaio pequenos (ex.: 13 x 75 mm) e suportes para tubos de ensaio
- Água destilada ou desionizada
- Recipiente de 1 litro
- Frasco de lavagem
- Toalhetes de papel
- Câmara de incubação

AVISOS E PRECAUÇÕES

Para uso em diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados para HbsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I e deram resultado negativo nos testes requeridos pela FDA. Todas as amostras de soro humano e produtos de origem humana devem ser tratados como sendo potencialmente perigosos, independentemente da sua origem. Devem-se respeitar as boas práticas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação destes materiais¹⁹.

AVISO: A azida de sódio (NaN₃) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação dessas azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director de laboratório ou um Centro Anti-Venenos.

As instruções devem ser seguidas à risca de forma a assegurar resultados válidos. Não trocar componentes dos kits com outros de outras origens diferentes do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Não utilize se estiverem fora do prazo de validade.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Nestas operações só devem ser usadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios podem interferir no rendimento deste teste e não devem ser usadas. Conservar entre 2 e 8 °C por não mais de uma semana. Para uma conservação mais prolongada devem ser congeladas a -20 °C. Evite congelações e descongelações repetidas.

PROCEDIMENTO

Método do teste

A. Despiste

1. Dilua cada soro do doente a 1:10 (20 µl de soro + 180 µl de diluente) dilua cada soro do doente a 1:40 (10 µl de soro + 390 µl de diluente). Não dilua os Controlos Negativo e Positivo. Conserve o soro não diluído para determinar a titulação de anticorpos, se os testes de controlo forem positivos.
2. Deixe que as bolsas com as lâminas de substrato estabilizem à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. Retire as lâminas com atenção sem tocar no substrato.

PT

- Rotule as lâminas e coloque-as na câmara de incubação revestida com toalhetes de papel humedecidos com água para evitar a secagem.
- Inverta o frasco conta-gotas e aperte delicadamente para aplicar 1 gota de Controlo Positivo ANA no poço n.º 2. Se aplicável, deite 1 gota de Controlo Positivo AMA no poço n.º 3. (1125, 1134). Evite encher demasiado os poços.
- Com uma micropipeta ou pipeta de Pasteur, deite 1 gota do soro diluído do doente (cerca de 50 µl) nos outros poços. Evite encher demasiado os poços.
- Coloque a tampa na câmara de incubação e incube as lâminas 30 minutos à temperatura ambiente.
- Retire a lâmina da câmara de incubação. Segure na lâmina pela extremidade e lave com cerca de 10 ml de PBS usando uma pipeta, ou lave a lâmina numa proveta com PBS. Não use o frasco de lavagem. Transfira imediatamente a lâmina para o recipiente de Coplin e lave 10 minutos. Repita a operação em todas as lâminas restantes.
- Retire a(s) lâmina(s) do recipiente de Coplin. Passe o bordo da lâmina num toalhete de papel para eliminar o excesso de PBS. Coloque a lâmina na câmara de incubação. Inverta imediatamente o frasco conta-gotas do Conjugado e aperte ligeiramente para deitar 1 gota (aproximadamente 50 µl) em cada poço.
- Repita os passos 7 e 8 em cada lâmina.
- Coloque a tampa na câmara de incubação. Incube por 30 minutos à temperatura ambiente.
- Retire uma lâmina da câmara de incubação. Segure na lâmina numa ponta e mergulhe-a num recipiente com PBS para eliminar o excesso de conjugado. Coloque a(s) lâmina(s) num recipiente de coloração com PBS durante 10 minutos. Se optar por usar conjugado sem contrastante (consultar componentes opcionais na secção Materiais fornecidos), poderá adicionar 2 a 3 gotas de contrastante azul de Evans à lavagem final. Repita a operação nas lâminas restantes. NOTA: Uma lavagem incorrecta pode levar a um aumento da fluorescência de fundo.
- Retire a lâmina do recipiente de coloração. Passe a aresta da lâmina num toalhete de papel para eliminar o excesso de PBS. **Para evitar que a lâmina seque, salte imediatamente ao passo seguinte enquanto a lâmina ainda está húmida.**
- Monte a lamela aplicando **3 gotas** de Meio de Montagem uniformemente na lamela e colocá-la sobre a lâmina. Não faça muita pressão e evite o deslizamento lateral da lamela.
- Repita os passos 12 e 13 em cada lâmina.
- Examine a fluorescência específica com microscópio de fluorescência com aumento de 200x ou mais.

As lâminas devem ser lidas assim que estiverem prontas. Contudo, devido à presença de um agente antidescoloração no meio de montagem, não há perdas significativas de intensidade de coloração, se a leitura for adiada até 48 horas. As lâminas devem ser conservadas às escuras entre 2 e 8°C.

B. Determinação final (titulação)

Um soro positivo no teste de controlo pode ainda ser mais testado seguindo os passos 5 ao 13 para determinar a titulação. Cada teste deve incluir os Controlos Positivo e Negativo. Efectue diluições em série e em duplicado partindo de 1:10. O recíproco da maior diluição que provoca uma reacção positiva é a titulação.

Preparação de diluições em série começando em 1:10

Numere os seis tubos de 1 a 6. Deite 0,9 ml de Diluente da Amostra no tubo 1 e 0,2 ml nos tubos 2 a 6. Pipete 0,1 ml de soro não diluído para o tubo 1 e mexa bem. Transfira 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e mexa bem. Continue a transferir 0,2 ml de um tubo para o outro após mexer para produzir as diluições descritas na tabela seguinte.

Tubos	1	2	3	4	5	6
Soro	0.1 ml					
	+					
Diluente tamponado	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Transferir	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	
Diluição final	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

Tubos	1	2	3	4	5	6
Soro	0.1 ml					
	+					
Diluente tamponado	3.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Transferir	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	
Diluição final	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:12

PT

CONTROLO DE QUALIDADE

Os Controlos Positivo e Negativo devem ser incluídos em cada teste. O Controlo Negativo não deverá apresentar uma fluorescência específica do núcleo, músculo liso, túbulos do rim ou células parietais gástricas. O Controlo Positivo AMA deve ter uma intensidade de coloração 2+ ou superior dos túbulos do rim. O Controlo Positivo ANA deve ter uma intensidade de coloração 2+ ou superior do núcleo do rim com um padrão homogéneo predominante.

Se não se obtiverem os resultados esperados, o teste deve ser repetido. Se resultados inadequados continuarem a ocorrer com os controlos, pode tratar-se de:

- Turvação. Elimine e use outro controlo.
- Problemas no sistema óptico do microscópio de fluorescência: Estes incluem: alinhamento incorrecto, lâmpada a precisar de ser mudada, etc.
- A lâmina secou durante o processo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados deverão ser reportados como positivos, negativos, ou, se tiver sido determinado um ponto final de titulação, positivos com titulação. Recomenda-se que nos substratos de rim e de rim e estômago de rato sejam reportadas como positivas as amostras dos pacientes que demonstrem reacções de fluorescência específicas associadas a ANA, AMA, ASMA e AGP a uma diluição de 1:10. Recomenda-se que no substrato HEp-2 as amostras dos pacientes que demonstrem reacções de fluorescência específicas a uma diluição de 1:40 sejam reportadas como positivas. Isto deverá servir como guia para a interpretação dos resultados. Cada laboratório deverá determinar os seus próprios valores normais para lidar com as diferenças de sistemas de microscopia, pessoal e formação.

Leia apenas os campos que contêm coloração específica do núcleo das células do rim e células HEp-2 e o padrão observado para ANA, os túbulos do rim para AMA, as paredes dos vasos sanguíneos do rim para ASMA e as células parietais gástricas apenas para AGPA. Todas as outras reacções devem ser registadas como negativas para ANA, AMA, ASMA e/ou AGPA.

Os ANA podem ser detectados em todos os substratos mas devem ser quantificados nas células do rim ou células HEp-2. Os padrões da coloração nuclear observáveis com o substrato de rim ou com as células HEp-2 fornecidas incluem homogéneos, periféricos (margem), mosqueados e nucleolares. O padrão de coloração dos centrómeros (incluindo as figuras mitóticas) apresenta-se mais facilmente nas células HEp-2. Estes padrões de coloração nuclear estão abaixo descritos. Esses poderão ser isolados ou uma combinação de diversos padrões de coloração. Os últimos são devidos a reacções a muitos antígenos nucleares diferentes.

Homogénea:	Todo o núcleo adquire fluorescência uniformemente com um padrão de coloração difuso.
Membranous nuclear:	A membrana nuclear mancha o mais intensa como o teste padrão muito bem linear com intensidade de mancha de diminuição do nucleoplasm para o centro do núcleo.
Mosqueada:	Algumas manchas discretas, de grosseiras a finas, adquirem fluorescência por todo o núcleo.
Nucleolar:	A coloração dos nucléolos como corpos sólidos múltiplos dentro dos núcleos.
Centrómeros:	Manchas grandes em quantidade limitada. Os antígenos reactivos separam-se com cromossomas condensados em células submetidas a mitose.

A especificidade de alguns dos anticorpos, que apresentam os padrões de coloração acima, poderá ser mais bem identificada por testes de anticorpos a nADN e a diversos antígenos nucleares extraíveis. Esses podem ter importância diagnóstica como indicados na tabela 1, no fim deste documento.

Os AMA poderão ser observados em ambos os túbulos, distais e proximais, do rim adquirindo os túbulos distais uma coloração mais brilhante. Embora o citoplasma das células parietais gástricas também adquira coloração, os AMA devem ser quantificados no rim.

Também se poderá observar a coloração dos músculos do estômago e dos glomérulos do rim com ASMA, mas só deverão ser registados os ASMA observados nas paredes dos vasos sanguíneos do rim.

Nas células HEp-2, os anticorpos citoplasmáticos detectáveis incluem anticorpos anti-mitochondriais (AMA) e os anticorpos anti-músculo liso (ASMA). Num padrão AMA, o citoplasma apresenta-se granular, enquanto o padrão ASMA é uma rede fibrilar de coloração por todo o citoplasma. Ambos os padrões devem ser registados como negativos para ANA. Os AGPA só reagem nas células parietais do estômago e provocam reacções citoplasmáticas. As reacções negativas no rim com reacções positivas no estômago são indicativas de AGPA.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Nalguns casos, o soro positivo a ANA poderá também ser muito fraco ou negativo na diluição de controlo inicial (fenómeno pró-zona). Nesses casos duvidosos o soro deve ser controlado em diluições mais elevadas e, se positivo, determinado o título dos anticorpos.

Nalguns casos a presença de dois ou mais anticorpos num soro os quais sejam reactivos com o mesmo substrato pode provocar uma interferência na sua detecção por imunofluorescência. Esta interferência poderá provocar a falta de detecção de ANA ou a supressão da sua titulação se o anticorpo de interferência tiver uma titulação superior a ANA. Deverão ser registadas todas as reacções ANA.

O Conjugado de IgG de cabra anti-humana com FITC, fornecido com este kit, é principalmente específico de cadeia pesada mas tem uma ligeira actividade de cadeia leve. Esse reage principalmente com auto-anticorpos de classe IgG, mas pode, a um grau inferior, reagir com cadeias leves de outras classes, tais como IgM.

Um ANA positivo não deverá ser considerado, por si só, como diagnóstico de LES. Também se apresentam em doentes com outras doenças do tecido conjuntivo e alguns medicamentos tais como procainamida e hidralazina podem provocar um resultado ANA positivo¹. Para além disso, o soro de doentes com doenças infecciosas e malignas também pode dar ANA positivo²⁰.

PT

Quando redigir um diagnóstico, o médico deve considerar os resultados de todos os testes de imunofluorescência indirecta positivos em conjunto com os resultados de outros testes de laboratório e a condição clínica do doente.

VALORES PREVISTOS

Como indicado nas Tabelas 2, 3, 4 e 6 no fim deste documento, os testes para anticorpos nucleares são usados para despiste de LES e de outras patologias imunológicas. Os AMA apresentam-se em mais de 90% dos casos de cirrose biliar primária e em 3 a 11% dos casos de hepatite crónica. Os ASMA apresentam-se na maioria dos casos de hepatite crónica activa e os AGPA são normalmente associados a anemia perniciosa e gastrite crónica atrofica.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O Sistema de Teste de Auto-anticorpos ImmuGlo™ foi comparado com outro teste de anticorpos fluorescentes obtido no comércio usando células HEP-2 como substrato. A comparação incluiu 15 amostras de soro de indivíduos saudáveis bem como soro de doentes com diagnóstico de LES, Lúpus eritematoso cutâneo subagudo, esclerodermia ou artrite reumatóide. Os soros foram testados de acordo com o método e diluição de controlo recomendados pelo fabricante. Estes resultados comparados obtidos estão abaixo resumidos:

Comparação de Kits usando Substrato de Células HEP-2 para a Detecção de Anticorpos Anti-nucleares

Condição Clínica	N.º de Soro	% Positiva	
		Immco™	Outro
LES	12	100	100
LE Cutânea subagudo (LECS)	7	85	85
Esclerodermia	6	100	100
Artrite Reumatóide	10	50	30
Controlos Normais	15	0	0

O Sistema de Teste de Auto-anticorpos ImmuGlo™ (Secções de Estômago/Rim de Murganho) foi comparado com outro teste de anticorpos fluorescente obtido no comércio usando estômago/rim de murganho como substrato. A comparação incluiu: 20 amostras de soro positivo a ANA, 19 amostras de soro positivo a AMA, 19 amostras de soro positivo a ASMA, 20 amostras de soro positivo a AGPA e 38 amostras de soro de sujeitos normais. Os soros foram testados a partir de uma diluição 1:10 com o método aconselhado pelo fabricante. Estes resultados comparados obtidos estão resumidos nas Tabelas 7 e 8, no fim deste documento.

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 33:167-240, 1982.
2. Kumar V, Beutner EH and Chorzelski TP. Autoimmunity of the skin. In "Concepts in Immunopathology", Vol 1. Cruse JM and Lewis RE Jr, Eds, Karger, Basel, 318-353, 1985.
3. Reimer G, Cornell RC and Tan EM. The biochemical nature of nuclear antigens reactive with antinuclear antibodies. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 519-531, 1987.
4. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Standardization of antinuclear antibody and other immunofluorescent tests used in immunopathologic studies of the skin. In "Immunopathology of the Skin". Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 41 -64, 1987.
5. Tan EM, Chan EKL, Sullivan KF and Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): Diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 47: 121 -141, 1988.
6. Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A and Meyer zum Büschenfelde KH. Significant autoimmune markers of autoimmune liver disorders: Current status. *J Clin Lab Anal* 1: 362-370, 1987.
7. Mackay IR. Autoimmunity and the liver. *Clin Aspects Immunity* 2: 8- 17, 1988.
8. McMillan SA, Alderdice JM, McKee CM et al. Diversity of autoantibodies in patients with anti-mitochondrial antibody and their diagnostic value. *J Clin Path* 4: 232-236, 1987.
9. Gershwin ME, Coppel RL and Mackay IR. Primary biliary cirrhosis and mitochondrial autoantigens – insights from molecular biology. *Hepatology* 8: 147-151, 1988.
10. Berg PA and Klein R. Mitochondrial antigens and autoantibodies from anti-M1 to anti-M9. *Klin Wochenschr* 64: 897-909, 1986.
11. Popper H and Paronetto F. Clinical, histologic and immunopathologic features of primary biliary cirrhosis. *Springer Semin Immunopathol* 3: 339-354, 1980.
12. Berg PA and Bacon H. Serology of primary biliary cirrhosis. *Springer Semin Immunopathol* 3: 355-373, 1980.
13. Anderson P, Small JV and Sobieszek A. Studies on the specificity of smooth muscle antibodies. *Clin Exp Immunol* 22: 22-29, 1975.
14. Kurki P, Miettinen A, Linder E, Pikkarainen P, Vuorio M and Salaspuro MP. Different types of smooth muscle antibodies in chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis: Their diagnostic and prognostic significance. *Gut* 21: 878-884, 1980.
15. Fisher JB and Taylor KB. The significance of gastric antibodies. *Brit J Haematol* 20: 1-7, 1971.
16. Chisholm M. Immunology of gastritis. *Clin Gastroenterol* 5: 419-428, 1976.
17. Bigazzi PE, Burek CL and Rose NR. Antibodies to tissue-specific endocrine, gastrointestinal and neurological antigens. In "Manual of Clinical Laboratory Immunology". Rose NR, Friedman H and Fahey JL, Eds, American Society for Microbiology, Washington DC, 762-770, 1986.
18. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 3-40, 1987.
19. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1999 [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395].
20. Nisengard RJ. Antinuclear antibodies: Significance of titers. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Bean S, Eds, John Wiley and Sons, New York, 2nd Ed, 387-398, 1979.
21. Meyer zum Büschenfelde KH, Manns M and Trautman F. Autoimmunity in chronic liver diseases – relationship to SLE? In "Recent Advances in Systemic Lupus Erythematosus". Lambert PH, Perrin L, and Izui S, Academic Press, New York, 259-269, 1984.
22. Walker JG, Doniach D, Roitt IM and Sherlock S. Serologic tests in the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Lancet*: 827, 1965.
23. Paronetto F and Popper H. Hetero-iso- and autoimmune phenomena in the liver. In "Textbook of Immunopathology", Miescher PA and Müller-Eberhard HJ, Eds, Grune and Stratton, New York, 2nd Ed, 789-817, 1976.
24. Leung PSC, Manns MP, Coppel RL, Gershwin ME. Detection of anti-mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis and liver-kidney microsomal antibodies in autoimmune hepatitis. In "Manual of Clinical Laboratory Immunology", Rose NR, Hamilton RG, Detrick B, Eds, ASM Press, Washington DC, 6th Ed, 1023-1031, 2002.
25. Muratori P et al. Smooth muscle antibodies and type 1 autoimmune hepatitis. *Autoimmunity*. 35 (8): pp. 497-500. 2002.
26. Gatselis NK et al. Autoantibodies in HCV-treated patients. *World J Gastroenterol*. 11(4):482-487. 2005.
27. Miller MH et al. Clinical comparison of cultured human epithelial cells and rat liver as substrates for the fluorescent antinuclear antibody test. *J Rheumatol*. 12 (2): 265-9. 1985.

Table 1. Diagnostic Significance of Antinuclear Antibodies

IF Staining Pattern	Nature of Antigen	Associated Disease
Homogeneous	dsDNA/Histones	SLE
Nuclear membranous	Laminins	SLE, vasculitis or chronic hepatitis
Speckled	RNP	SLE or MCTD*
	Sm	SLE
	SS-A/SS-B	SLE or Sjögren's Syndrome
	Sci-70	Scleroderma
Nucleolar probably U3 RNA	RNAP-I Pm-Scl RNA	Scleroderma
Centromere/Kinetochore	inner and outer plates of kinetochore	CREST syndrome

*Mixed Connective Tissue Disease

Table 2: Incidence of Antinuclear Antibodies (ANA) Detected by Indirect Immunofluorescence on HEp-2 Cells

Clinical Condition	No. of Sera	% Positive
SLE	12	100
Subacute Cutaneous LE (SCLE)	7	86
Scleroderma	6	100
Rheumatoid Arthritis	10	50
Normal Controls	15	0

Table 3: Incidence of Antinuclear Antibodies (ANA) Detected by Indirect Immunofluorescence on Mouse Kidney Substrate

Clinical Condition	No. of Sera	% Positive
SLE	21	95
Scleroderma	17	82
Rheumatoid Arthritis	20	5
Normal Controls	96	0

Table 4: Incidence of Anti-Mitochondrial Antibodies (AMA) Detected by IFA on Mouse Kidney Substrate

Clinical Condition	% Positive
Primary Biliary Cirrhosis	100
Autoimmune Chronic Active Hepatitis	8
HBsAg and Chronic Active Hepatitis	0
Extrahepatic Jaundice and Other Liver Diseases	0
Systemic Lupus Erythematosus (SLE)	3
Rheumatoid Arthritis	0
Normal Controls	0

Adapted from Meyer zum Buschenfelde KH, et al.²¹; Walker JG, et al.²² and Paronetto F and Popper H²³.

Table 5: Incidence of Anti-Smooth Muscle Antibodies (ASMA) as Detected by IFA on Mouse Kidney Substrate

Clinical Condition	% Positive
Chronic Active Hepatitis (Type A)	50-87
Primary Biliary Cirrhosis	25
Acute Viral Hepatitis	87
Infectious Mononucleosis	87
Burkitt's Lymphoma	73
Nasopharyngeal Carcinoma	23
Hodgkin's Disease	23
Myeloproliferative Disorder	5
Warts	4
Normal Controls	3-18

Adapted from Anderson P, et al.¹³

Table 6. Incidence of Anti-Gastric Parietal Cell Antibodies (AGPA) as Detected by Indirect Immunofluorescence on Mouse Stomach Substrate

Clinical Condition	% Positive
Pernicious Anemia (PA)	85-95
Chronic Atrophic Gastritis without PA	30-60
Gastric Ulcer	25-30
Autoimmune Endocrinopathies	25-33
Sjögren's Syndrome	30
First Degree Relatives of PA Patients	30
Normal Controls	
< 20 years old	2
20-60 years old	6-8
> 60 years old	16

Table 7. Findings in Positive Sera

	n	Negatives		Positives Titer			
		<10	10-20	40-80	160-320	640-2560	
ANA Positive Sera							
Immco™	20	0	0	7	6	7	
Other	20	0	0	7	8	5	
AMA Positive Sera							
Immco™	19	4	1	3	1	10	
Other	19	4	1	3	4	7	
ASMA Positive Sera							
Immco™	19	3	4	8	4	0	
Other	19	2	5	6	5	1	
AGPA Positive Sera							
Immco™	20	0	1	6	4	9	
Other	20	0	2	6	7	5	

Table 8. Findings in Normal Controls

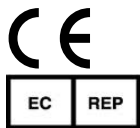
	n	Negatives		Positives Titer		
		<10	10-20	40-80	>160	
ANA Positive						
Sera						
Immco™	38	30	3	5	0	
Other	38	36	0	2	0	
AMA Positive						
Sera						
Immco™	38	38	0	0	0	
Other	38	38	0	0	0	
ASMA Positive						
Sera						
Immco™	38	35	2	1	0	
Other	38	29	8	1	5	
AGPA Positive						
Sera						
Immco™	38	37	0	1	0	
Other	38	37	0	1	0	

For technical assistance please contact:



IMMCO Diagnostics, Inc.
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST
E-Mail: info@immcodiagnostics.com

or your local product distributor



EMERGO Europe
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands
www.emergogroup.com

REV. SEPT2013
Document No. PI4125 CE