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

EN

General Immunofluorescence Assay Method

PRODUCT INSERT

INTENDED USE
The components listed above may be used for detection of antibodies in human serum by indirect immunofluorescence.

SUMMARY AND EXPLANATION
These instructions for use provide a general protocol for use of substrate slides and conjugates appropriate for indirect immunofluorescence studies. Autoantibodies may be visualized on a variety of tissue section and cell culture substrates using a FITC conjugate system. The principle of the procedure is described in the following section. Individual laboratories may use this product insert as a guide but should perform internal validation of internal protocols using these materials.

PRINCIPLES OF PROCEDURE
The components listed above may be utilized in indirect immunofluorescence protocols. In such a protocol, patient sera is incubated on a substrate slide to allow binding of antibodies. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgA, IgG and/or IgM class, as determined by the conjugate used, are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled, anti-human conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of antibodies may be demonstrated by an apple green fluorescence of specific histological structures in the substrate. The titer may be determined by serial dilution of the specimen. The reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction is the titer.[1]

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

Materials provided
These instructions are provided for use with individual components, including the product codes listed below. Substrate slides are listed alongside the conjugate appropriate for detection of autoantibodies on the particular substrate.

Substrate Slide		Conjugate		Positive Control		Specimen Dilution	Sample Incubation Time*
[REF]	Description	[REF]	Description	[REF]	Description		
2123-4	Primate Adrenal Gland Slide, 4 well	2099	Anti-human IgG FITC with Evans Blue Counterstain, 5ml (primate-adsorbed)	2279	Adrenal Antibody Positive Control	1:4	30 minutes
2124	Primate Salivary Gland Slide, 6 well	2099	Anti-human IgG FITC with Evans Blue Counterstain, 5ml (primate-adsorbed)	2201	ANA Homogeneous Control	1:10	30 minutes
2125-4	Primate Ovary Slide, 4 well	2099	Anti-human IgG FITC with Evans Blue Counterstain, 5ml (primate-adsorbed)	2206	Steroidal Cell Antibody Positive Control	1:10	3 hours
2128	Primate Cerebellum Slide, 6 well	2099	Anti-human IgG FITC with Evans Blue Counterstain, 5ml (primate-adsorbed)	2280	Hu Antibody Positive Control	1:10	30 minutes
2129-4	Primate Testis Slide, 4 well	2099	Anti-human IgG FITC with Evans Blue Counterstain, 5ml (primate-adsorbed)	2206	Steroidal Cell Antibody Positive Control	1:10	3 hours
2134	Primate Sciatic Nerve Slide, 6 well	2140	Goat antihuman IgM FITC with Evans Blue Counterstain, 5ml	2209	MAG Antibody Positive Control	1:10	30 minutes
2147	Primate Split Skin Slide, 6 well	2099	Anti-human IgG FITC with Evans Blue Counterstain, 5ml (primate-adsorbed)	2213 and/or 2217	Intercellular Antibody Positive Control and/or BMZ Antibody Positive Control	1:10	30 minutes

2155	Primate Esophagus Slide, 4 well	2100 (or 2099)	Goat anti-human IgG FITC with Evans Blue Counterstain, 5ml (primate-adsorbed)	2213 and/or 2217	Intercellular Antibody Positive Control and/or BMZ Antibody Positive Control	1:10	30 minutes
2156	Transitional Epithelium slide 6 well	2100	Goat anti-human IgG FITC with Evans blue counterstain	2241	PNP positive Control	1:10	30 minutes
2157	Primate Heart Muscle Slide, 6 well	2099	Anti-human IgG FITC with Evans Blue Counterstain, 5ml (primate-adsorbed)	2235	Heart/ Skeletal Muscle Antibody Positive Control	1:10	30 minutes
2158	Primate Skeletal Muscle Slide, 6 well	2099	Anti-human IgG FITC with Evans Blue Counterstain, 5ml (primate-adsorbed)	2235	Heart/ Skeletal Muscle Antibody Positive Control	1:10	30 minutes
2164	Primate Stomach Slide, 6 well	2099	Anti-human IgG FITC with Evans Blue Counterstain, 5ml (primate-adsorbed)	2211	ASMA Positive Control	1:10	30 minutes
2180	Primate Thyroid Slide, 6 well	2099	Anti-human IgG FITC with Evans Blue Counterstain, 5ml (primate-adsorbed)	2239	Thyroid/ Microsomal Antibody Positive Control	1:10	30 minutes

* The second incubation (conjugate incubation) in all cases is 30 minutes.

Optional components

[REF]	Description	U/M
2099	Primate-adsorbed goat anti-human IgG FITC with Evans blue counterstain	5ml
2100	Goat anti-human IgG FITC with Evans blue counterstain	5ml
2100x	Goat anti-human IgG FITC without Evans blue counterstain	5ml
2100-15	Goat anti-human IgG FITC with Evans blue counterstain	15ml
2100-15x	Goat anti-human IgG FITC without Evans blue counterstain	15ml
2107	Goat anti-human IgA FITC with Evans blue counterstain	5ml
2107x	Goat anti-human IgA FITC without Evans blue counterstain	5ml
2107-15	Goat anti-human IgA FITC with Evans blue counterstain	15ml
2107-15x	Goat anti-human IgA FITC without Evans blue counterstain	15ml
2113	Goat anti-human polyvalent FITC (IgG/IgA) with Evans blue counterstain	5ml
2113x	Goat anti-human polyvalent FITC (IgG/IgA) without Evans blue counterstain	5ml
2113-15	Goat anti-human polyvalent FITC (IgG/IgA) with Evans blue counterstain	15ml
2113-15x	Goat anti-human polyvalent FITC (IgG/IgA) without Evans blue counterstain	15ml
2130	Goat anti-human polyvalent FITC (IgG/IgA/IgM) with Evans blue counterstain	5ml
2130x	Goat anti-human polyvalent FITC (IgG/IgA/IgM) without Evans blue counterstain	5ml
2130-15	Goat anti-human polyvalent FITC (IgG/IgA/IgM) with Evans blue counterstain	15ml
2130-15x	Goat anti-human polyvalent FITC (IgG/IgA/IgM) without Evans blue counterstain	15ml
2140	Goat anti-human IgM FITC with Evans blue counterstain	5ml
2140x	Goat anti-human IgM FITC without Evans blue counterstain	5ml
2200	IFA Negative Control	0.5ml
2201	ANA Homogeneous Positive Control	0.5ml
2206	anti-Steroidal Cell Positive Control	0.5ml
2209	anti-MAG Positive Control	0.5ml
2211	ASMA Positive Control	0.5ml
2213	anti-IC Positive Control	0.5ml
2213-1	IC Low Titer Control	0.5ml
2214	anti-IC Positive Control (*pemphigus vulgaris*)	0.5ml
2216	anti-IC Positive Control (*pemphigus foliaceus*)	0.5ml
2217	anti-BMZ Positive Control (pemphigoid)	0.5ml

2235	anti-Heart/Skeletal Muscle Positive Control	0.5ml
2239	anti-Thyroid/Microsomal Positive Control	0.5ml
2279	anti-Adrenal Positive Control	0.5ml
2280	anti-Hu Positive Control	0.5ml
2301	PBS	for 1 liter
2302	Sample Diluent	60ml
2500	Microscope Slide Coverglass (24x60mm)	box of 12
2505	Mounting Medium Dropper Vial	5ml
2510	Evans Blue Counterstain	1.0ml

Symbols used on labels:

[LOT]	Lot number
[REF]	Catalog number
e	Use by
t	Storage temperature
!	Read instructions for use
[IVD]	In vitro diagnostic use
	Manufacturer
S	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
- Wash bottle
- 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 materials.[2]
WARNING - Sodium azide (NaN_3) 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.

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
1. Dilute each patient serum with the Buffered Diluent according to the dilution recommended in the Materials Provided section. 1:4 (0.1 ml serum + 0.3 ml diluent) or 1:10 (10 µl serum + 90 µl diluent). Do not dilute Positive or Negative Controls to be used. 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. If applicable, apply 1 drop of Positive Control to well #2. 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 at room temperature according to the Sample Incubation Time recommended in the Materials Provided section.
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 Evans 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 titer. Make serial two-fold dilutions starting at the initial screening dilution. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer. Tables for standard screening dilutions are provided below:

Preparation of Serial Dilutions Starting at 1:4

Number six tubes 1 through 6. Add 0.3 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	0.3 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	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128 etc.

Preparation of Serial Dilutions Starting at 1:10

Number six tubes 1 through 6. 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.

QUALITY CONTROL

Both a Positive and Negative Control should be included with each test run. The Negative Control should show no specific fluorescence. The laboratory must determine the appropriate performance characteristics of the Positive Control used.

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

Immunofluorescence assay results are generally reported as negative with a titer less than the screening dilution, positive with a titer greater than or equal to the screening dilution or, preferably, positive with specific endpoint titer. Laboratories must validate protocols for use of these materials and train technicians to read specific fluorescence patterns appropriate to the materials used and testing performed.

LIMITATION OF THE PROCEDURE

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.

Γενική Μέθοδος Δοκιμής Ανοσοφθορισμού

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

ΣΚΟΠΟΥΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Τα συστατικά που αναγράφονται στην ενότητα “Υλικά” μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση αντισωμάτων στον ανθρώπινο ορό με έμμεσο ανοσοφθορισμό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Οι παρούσες οδηγίες για χρήση παρέχουν πρωτόκολλο γενικής χρήσης αντικειμενοφόρες πλάκες υποστρώματος και συζεύξεις κατάλληλες για μελέτες έμμεσου ανοσοφθορισμού. Αυτοαντισώματα ενδέχεται να οπτικοποιηθούν σε μια ποικιλία ιστοτεμαχίων και κυτταροκαλλιέργειας σε υποστρώματα με τη χρήση συζευκτικού συστήματος αντισωμάτων FITC. Η αρχή της διαδικασίας περιγράφεται στην επόμενη ενότητα. Ξεχωριστά εργαστήρια ενδέχεται να χρησιμοποιούν αυτό το ένθετο προϊόντος ως οδηγό ωστόσο θα πρέπει να πραγματοποιεί εσωτερική τεκμηρίωση εσωτερικών πρωτοκόλλων με τη χρήση αυτών των υλικών.

ΑΡΧΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Τα συστατικά που αναγράφονται στην ενότητα “Υλικά” μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πρωτόκολλα άμεσου ανοσοφθορισμού. Σε αυτό το πρωτόκολλο ορός του ασθενούς επωάζεται σε αντικειμενοφόρο πλάκα υποστρώματος ώστε να επιτρέπει τη δέσμευση αντισωμάτων. Τα αδέσμευτα αντισώματα αφαιρούνται με την πλύση. Τα αντισώματα κατηγορίας IgA, IgG και/ή IgM, που έχουν δεσμευθεί όπως καθορίζεται στη χρησιμοποιούμενη σύζευξη, ανιχνεύονται με την επώαση του υποστρώματος με συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης το οποίο είναι σεσημασμένο με φλουοροσκεΐνη. Αντιδράσεις παρατηρούνται κάτω από μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού εξοπλισμένο με κατάλληλα φίλτρα. Η παρουσία των αντιδράσεων των αντισωμάτων διαπιστώνεται με την παρουσία φθορισμού έντονου πράσινου χρώματος σε συγκεκριμένες ιστολογικές δομές στο υπόστρωμα. Ο τίτλος μπορεί να καθορισθεί με διαδοχική αραίωση του δείγματος. Ο τίτλος είναι το αντίστροφο της μεγαλύτερης αραίωσης που έδωσε θετική αντίδραση[1].

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Φύλαξη και προετοιμασία

Φυλάξτε όλα τα αντιδραστήρια στους 2-8°C. Τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα για χρήση εφόσον φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Υλικά

Οι παρούσες οδηγίες παρέχονται για χρήση με ξεχωριστά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των κωδικών προϊόντος που αναγράφονται κατωτέρω. Οι αντικειμενοφόροι υποστρώματος αναγράφονται δίπλα στην σύζευξη που είναι κατάλληλη για την ανίχνευση αντισωμάτων στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Αντικειμενοφόροι Υποστρώματος		Σύζευξη		Θετικός Έλεγχος		Αραίωση Δείγματος	Χρόνος Επώασης Δείγματος*
[REF]	Περιγραφή	[REF]	Περιγραφή	[REF]	Περιγραφή		
2123-4	Πρωτεύουσα Αντικειμενοφόρος Πλάκα Πρωτεύοντος Επινεφριδίου, 4 βυθισμάτων	2099	FITC (ισοθειοκυανική φλουορεϊσίνη) αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans, 5ml (απορρόφηση πρωτευόντων)	2279	Θετικός Έλεγχος Αντισωμάτων Επινεφριδίων	1:4	30 λεπτά
2124	Πρωτεύουσα Αντικειμενοφόρος Πλάκα Σιελογόνου Αδένος, 6 βυθισμάτων	2099	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans, 5ml (απορρόφηση πρωτευόντων)	2201	Ομοιογενής Έλεγχος ANA	1:10	30 λεπτά
2125-4	Πρωτεύουσα Αντικειμενοφόρος Πλάκα Ωοθήκης, 4 βυθισμάτων	2099	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans, 5ml (απορρόφηση πρωτευόντων)	2206	Θετικός Έλεγχος Στεροειδών Κυττάρων	1:10	3 ώρες

2128	Πρωτεύουσα Αντικειμενοφόρος Πλάκα Παρεγκεφαλίδας, 6 βυθισμάτων	2099	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans, 5ml (απορρόφηση πρωτευόντων)	2280	Θετικός Έλεγχος Αντισωμάτων Hu	1:10	30 λεπτά
2129-4	Πρωτεύουσα Αντικειμενοφόρος Πλάκα Όρχεως, 4 βυθισμάτων	2099	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans, 5ml (απορρόφηση πρωτευόντων)	2206	Θετικός Έλεγχος Στεροειδών Κυττάρων	1:10	3 ώρες
2134	Πρωτεύουσα Αντικειμενοφόρος Πλάκα Ισχιακού Νεύρου, 6 βυθισμάτων	2140	FITC αντι-ανθρώπινης IgM αίγας με μπλε αντίχρωση Evans, 5ml (απορρόφηση πρωτευόντων)	2209	Θετικός Έλεγχος Αντισωμάτων MAG	1:10	30 λεπτά
2147	Πρωτεύουσα Αντικειμενοφόρος Πλάκα Διασπασμένου Δέρματος, 6 βυθισμάτων	2099	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans, 5ml (απορρόφηση πρωτευόντων)	2213 και/ή 2217	Θετικός Έλεγχος Ενδοκυτταρικών Αντισωμάτων και/ή Θετικός Έλεγχος Αντισωμάτων BMZ	1:10	30 λεπτά
2155	Πρωτεύουσα Αντικειμενοφόρος Πλάκα Οισοφάγου, 4 βυθισμάτων	2100 (ή 2099)	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans, 5ml (απορρόφηση πρωτευόντων)	2213 και/ή 2217	Θετικός Έλεγχος Ενδοκυτταρικών Αντισωμάτων και/ή Θετικός Έλεγχος Αντισωμάτων BMZ	1:10	30 λεπτά
2156	μεταβατικό επιθήλιο Πλάκα, 6 βυθισμάτων	2100	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans	2241	PNP Θετικός Έλεγχος	1:10	30 λεπτά
2157	Πρωτεύουσα Αντικειμενοφόρος Πλάκα Μυός, 6 βυθισμάτων	2099	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans, 5ml (απορρόφηση πρωτευόντων)	2235	Θετικός ορός ελέγχου Καρδιακών/Σκελετικού Μυός αντισωμάτων	1:10	30 λεπτά
2158	Πρωτεύουσα Αντικειμενοφόρος Πλάκα Σκελετικού Μυός, 6 βυθισμάτων	2099	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans, 5ml (απορρόφηση πρωτευόντων)	2235	Θετικός ορός ελέγχου Καρδιακών/Σκελετικού Μυός αντισωμάτων	1:10	30 λεπτά
2164	Πρωτεύουσα Αντικειμενοφόρος Πλάκα Στομάχου, 6 βυθισμάτων	2099	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans, 5ml (απορρόφηση πρωτευόντων)	2211	Θετικός Έλεγχος ASMA	1:10	30 λεπτά
2180	Πρωτεύουσα Αντικειμενοφόρος Πλάκα Θυρεοειδούς, 6 βυθισμάτων	2099	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans, 5ml (απορρόφηση πρωτευόντων)	2239	Θετικός ορός ελέγχου αντιθυρεοειδικών/μικροσωμιακών αντισωμάτων	1:10	30 λεπτά

* Η δεύτερη επώαση (επώαση σύζευξης) σε όλες τις περιπτώσεις είναι 30 λεπτά.

Προαιρετικά συστατικά

[REF]	Περιγραφή	U/M
2099	FITC (απορρόφηση πρωτευόντων) αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans	5ml
2100	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans	5ml
2100x	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας χωρίς μπλε αντίχρωση Evans	5ml
2100-15	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας με μπλε αντίχρωση Evans	15ml
2100-15x	FITC αντι-ανθρώπινης IgG αίγας χωρίς μπλε αντίχρωση Evans	15ml
2107	FITC αντι-ανθρώπινης IgA αίγας με μπλε αντίχρωση Evans	5ml
2107x	FITC αντι-ανθρώπινης IgA αίγας χωρίς μπλε αντίχρωση Evans	5ml
2107-15	FITC αντι-ανθρώπινης IgA αίγας με μπλε αντίχρωση Evans	15ml
2107-15x	FITC αντι-ανθρώπινης IgA αίγας χωρίς μπλε αντίχρωση Evans	15ml
2113	FITC αντι-ανθρώπινης αίγας πολυσθενική (IgG/IgA) με μπλε αντίχρωση Evans	5ml
2113x	FITC αντι-ανθρώπινης αίγας πολυσθενική (IgG/IgA) χωρίς μπλε αντίχρωση Evans	5ml
2113-15	FITC αντι-ανθρώπινης αίγας πολυσθενική (IgG/IgA) με μπλε αντίχρωση Evans	15ml
2113-15x	FITC αντι-ανθρώπινης αίγας πολυσθενική (IgG/IgA) χωρίς μπλε αντίχρωση Evans	15ml
2130	FITC αντι-ανθρώπινης αίγας πολυσθενική (IgG/IgA/IgM) με μπλε αντίχρωση Evans	5ml
2130x	FITC αντι-ανθρώπινης αίγας πολυσθενική (IgG/IgA/IgM) χωρίς μπλε αντίχρωση Evans	5ml
2130-15	FITC αντι-ανθρώπινης αίγας πολυσθενική (IgG/IgA/IgM) με μπλε αντίχρωση Evans	15ml
2130-15x	FITC αντι-ανθρώπινης αίγας πολυσθενική (IgG/IgA/IgM) χωρίς μπλε αντίχρωση Evans	15ml
2140	FITC αντι-ανθρώπινης IgM αίγας με μπλε αντίχρωση Evans	5ml
2140x	FITC αντι-ανθρώπινης IgM αίγας χωρίς μπλε αντίχρωση Evans	5ml
2200	Αρνητικός ορός ελέγχου IFA	0.5ml
2201	Θετικός ορός ομοιογενούς ελέγχου ANA	0.5ml
2206	Θετικός ορός ελέγχου αντισωμάτων αντιστεροειδών κυττάρων	0.5ml
2209	Θετικός ορός ελέγχου αντισωμάτων anti-MAG	0.5ml
2211	Θετικός ορός ελέγχου ASMA	0.5ml
2213	Θετικός ορός ελέγχου αντισωμάτων anti-IC	0.5ml
2213-1	Έλεγχος Χαμηλού Τίτλου IC	0.5ml
2214	Θετικός ορός ελέγχου αντί-IC (*κοινή πέμφιγα*) (*pemphigus vulgaris*)	0.5ml
2216	Θετικός ορός ελέγχου αντί-IC (*φυλλώδης πέμφιγα*) (*pemphigus foliaceus*)	0.5ml
2217	Θετικός ορός ελέγχου αντί-BMZ (*πέμφιγα*) (pemphigoid)	0.5ml
2235	Θετικός ορός ελέγχου αντί-Καρδιακών/Σκελετικού Μυός αντισωμάτων	0.5ml
2239	Θετικός ορός ελέγχου αντιθυρεοειδικών/μικροσωμιακών αντισωμάτων	0.5ml
2279	Θετικός ορός ελέγχου αντι-επινεφριδιακών αντισωμάτων	0.5ml
2280	Θετικός ορός ελέγχου αντισωμάτων anti-Hu	0.5ml
2301	PBS	για 1 λίτρο
2302	Διάλυμα Αραίωσης Δείγματος	60ml
2500	Αντικειμενοφόρος Πλάκα Μικροσκοπίου Coverglass (24x60mm)	κουτί των 12
2505	Σταγονόμετρο Mounting Medium	5ml
2510	Αντίχρωση Evans Blue	1.0ml

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται σε ετικέτες:

[LOT]	Αριθμός παρτίδας
[REF]	Αριθμός καταλόγου
e	Ημερομηνία λήξης
t	Θερμοκρασία αποθήκευσης
!	Διαβάστε τις οδηγίες πριν τη χρήση
[IVD]	Για in vitro διαγνωστική χρήση
	Κατασκευαστής
s	Αριθμός Δοκιμών

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται
• Μικροσκόπιο φθορισμού
• Μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur
• Ορολογικές πιπέτες
• Τρύβλιο χρώσης (π.χ. δοχείο Coplin)
• Μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες (π.χ. διαστάσεων 13 x 75 mm) και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
• Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
• Περιέκτης 1 λίτρου
• Φιάλη έκπλυσης
• Απορροφητικές χάρτινες χειροπετσέτες
• 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 ΗΠΑ (FDA). Όλα τα δείγματα ανθρώπινου ορού και προϊόντων ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα, ανεξάρτητα από την προέλευσή τους. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έκχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών[2].
ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN3) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη των υγρών, εκπλύνετε 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.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ
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. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2-8°C για διάστημα όχι μεγαλύτερο της μίας εβδομάδας. Για φύλαξη μεγαλύτερης διάρκειας, ο ορός θα πρέπει να καταψύχεται στους -20°C. Να αποφεύγεται η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ
Μέθοδος Δοκιμής
Α. Διαλογή
1. Αραιώστε τον ορό κάθε ασθενούς με το Ρυθμιστικό Διάλυμα σύμφωνα με το διάλυμα που συνιστάται στην ενότητα Παρεχόμενα Υλικά . 1:4 (0.1 ml ορού + 0.3 ml διάλυμα αραίωσης) ή 1:10 (10 μl ορού + 90 μl διάλυμα αραίωσης). Μην αραιώνετε τα διαλύματα Θετικού ή Αρνητικού Ελέγχου που θα χρησιμοποιηθούν. 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, για να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση.
4. Αναστρέψτε το σταγονόμετρο και πιέστε το ελαφρά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μl) του διαλύματος Αρνητικού Ελέγχου στην κυψελίδα υπ' αριθμόν 1. Με τον ίδιο τρόπο, προσθέστε 1 σταγόνα διαλύματος Θετικού Ελέγχου στην κυψελίδα υπ' αριθμόν 2. 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 σε θερμοκρασία δωματίου σύμφωνα με τον Χρόνο Επώασης Δείγματος που συνιστάται στην ενότητα Παρεχόμενα Υλικά.
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 ποτήρι ζέσεως που περιέχει PBS. Μη χρησιμοποιείτε φιάλη έκπλυσης. Μεταφέρετε την αντικειμενοφόρο αμέσως στο δοχείο Coplin και εκπλύνετε επί 10 λεπτά**.** Επαναλάβετε τη διαδικασία με όλες τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους.
8. Αφαιρέστε την(τις) αντικειμενοφόρο(ους) από το δοχείο Coplin. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. Τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο στον θάλαμο επώασης. Αναστρέψτε αμέσως το σταγονόμετρο με το συζευκτικό αντίσωμα 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 το καπάκι στο θάλαμο επώασης και επωάστε τις αντικειμενοφόρους επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

11. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο και εμβυθίστε την αντικειμενοφόρο σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει PBS για να αφαιρέσετε την περίσσεια σύζευξης. Τοποθετήστε την(τις) αντικειμενοφόρο(ους) σε τρυβλίο χρώσης γεμάτο με PBS για 10 λεπτά. Εάν χρησιμοποιείται προαιρετική σύζευξη χωρίς αντίχρωση (δείτε προαιρετικά συστατικά στην Ενότητα Παρεχόμενα Υλικά), μπορούν να προστεθούν 2-3 σταγόνες από αντίχρωση Evans Blue στην τελική πλύση. Επαναλάβετε τη διαδικασία με όλες τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: σφαλμένη πλύση ενδέχεται να οδηγήσει σε αυξημένο φθορισμό υποστρώματος.
12. Αφαιρέστε μια αντικειμενοφόρο από το τρυβλίο χρώσης. Στυπώστε το άκρο της αντικειμενοφόρου σε απορροφητική χάρτινη χειροπετσέτα για να αφαιρέσετε περίσσεια PBS. **Για να αποφύγετε την αποξήρανση της αντικειμενοφόρου, προχωρήστε αμέσως στο επόμενο βήμα ενώ η αντικειμενοφόρος είναι ακόμη υγρή.**
13. Στηρίξτε την καλυπτρίδα εφαρμόζοντας **3 σταγόνες** του Mounting Medium ομαλά στην καλυπτρίδα και τοποθετήστε την καλυπτρίδα πάνω από την αντικειμενοφόρο. Αποφύγετε την εφαρμογή υπερβολικής πίεσης και μποδίστε την πλευρική κίνηση της καλυπτρίδας.
14. Επαναλάβετε τα βήματα 12 και 13 για κάθε αντικειμενοφόρο.

15. Εξετάστε για ειδικό φθορισμό με μικροσκόπιο φθορισμού σε μεγέθυνση 200χ 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 καθυστερήσει η ανάγνωση έως και 48 ώρες. Οι αντικειμενοφόροι θα πρέπει να φυλάσσονται σε σκοτεινό χώρο, σε θερμοκρασία 2-8°C.

Β. Καθορισμός Τελικού Σημείου (τιτλοδότηση)
Ένας ορός που θα βρεθεί θετικός στην ανάλυση διαλογής μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω, ακολουθώντας τα **βήματα** 5 έως 13 για να καθοριστεί ο τίτλος του. Εκτελέστε διαδοχικές διπλές αραιώσεις ξεκινώντας από την αρχική αραίωση διαλογής. Ο τίτλος είναι το αντίστροφο της μεγαλύτερης αραίωσης που έδωσε θετική αντίδραση. Πίνακες για πρότυπες αραιώσεις διαλογής παρέχονται κατωτέρω:

Προετοιμασία των Διαδοχικών Αραιώσεων Ξεκινώντας στο 1:4
Αριθμήστε έξι σωληνάρια από το 1 έως το 6. Προσθέστε 0.3 ml Διαλύματος Αραίωσης Δείγματος 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:

Σωληνάρια	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Ορός	0.1 ml					
	+					
Αραιωτικό Ρυθμιστικό Διάλυμα	0.3 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 αραίωση	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128 κ.λπ.

Προετοιμασία των Διαδοχικών Αραιώσεων που Ξεκινούν στο 1:10
Αριθμήστε έξι σωληνάρια από το 1 έως το 6. Προσθέστε 0.9 ml Διαλύματος Αραίωσης Δείγματος 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:

Σωληνάρια	**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 αραίωση	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 κ.λπ.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ
Τόσο ο Θετικός όσο και ο Αρνητικός Ορός μάρτυρα θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε κάθε εκτέλεση δοκιμής. Ο Αρνητικός Ορός μάρτυρα δεν θα πρέπει να παρουσιάζει συγκεκριμένο φθορισμό. Το εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει τα κατάλληλα χαρακτηριστικά εκτέλεσης του Θετικού ορού μάρτυρα που χρησιμοποιείται.

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

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα δοκιμών ανοσοφθορισμού αναφέρονται γενικώς ως αρνητικά με τίτλο μικρότερο από την αραίωση διαλογής, θετικά με τίτλο μεγαλύτερο από ή ίσο με την αραίωση διαλογής ή, κατά προτίμηση, θετικά με συγκεκριμένο τίτλο τελικού σημείου. Τα εργαστήρια πρέπει να τεκμηριώνουν πρωτόκολλα χρήσης αυτών των υλικών και να εκπαιδεύουν τους τεχνικούς ώστε να διαβάζουν συγκεκριμένα μοτίβα φθορισμού κατάλληλα προς τα υλικά που χρησιμοποιούνται και τους ελέγχους που εκτελούνται.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Τα αποτελέσματα όλων των θετικών δοκιμών άμεσου ανοσοφθορισμού μαζί με τα αποτελέσματα άλλων εργαστηριακών δοκιμών και η κλινική κατάσταση του ασθενούς κατά την πραγματοποίηση της διάγνωσης.

Método de ensayo de inmunofluorescencia general

ETIQUETA DEL PRODUCTO

UTILIZACIÓN PREVISTA
Los componentes incluidos en la sección “Materiales” pueden ser utilizados para detectar anticuerpos en suero humano mediante inmunofluorescencia indirecta.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN
Estas instrucciones de uso proporcionan un protocolo general para utilizar muestras de sustrato y conjugados adecuados para estudios de inmunofluorescencia indirecta. Los autoanticuerpos pueden ser visualizados en variedad de secciones de tejido y sustratos de cultivos celulares utilizando un sistema de conjugado de isocianato de fluoresceína (FITC). Los puntos básicos del procedimiento se describen en la sección siguiente. Los laboratorios concretos pueden utilizar esta etiqueta de producto como guía pero deberían realizar evaluaciones internas de los protocolos de uso para estos materiales.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO
Los componentes incluidos dentro de los "Materiales" pueden ser utilizados en protocolos de inmunofluorescencia indirecta. En ese tipo de protocolos, el suero del paciente es incubado en una muestra de sustrato para que los anticuerpos se unan. Cualquier anticuerpo que no quede unido es eliminado enjuagándolo. Los anticuerpos unidos de clase IgA, IgG y/o IgM, en función del conjugado utilizado, son detectados mediante la incubación del sustrato con conjugado antihumano con fluoresceína. Se observan las reacciones bajo un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros adecuados. La presencia de anticuerpos puede ser demostrada mediante una fluorescencia verde manzana de estructuras histológicas específicas en el sustrato. La titulación puede ser determinada por la dilución en serie del espécimen. El recíproco de la dilución más elevada que dé una reacción positiva es la titulación.[1]

INFORMACIÓN DEL PRODUCTO
Almacenamiento y preparación
Guarde todos los reactivos a 2-8ºC. Los reactivos están listos para ser utilizados después de equilibrarlos con la temperatura ambiente.

Materiales
Se proporcionan estas instrucciones para utilizarlas con los componentes individuales, incluyendo los códigos de producto incluidos a continuación. Las muestras de sustrato aparecen al lado del conjugado adecuado para detectar autoanticuerpos en ese sustrato concreto.

Muestra de sustrato		Conjugado		Control positivo		Dilución de espécimen	Tiempo de incubación de la muestra*
[REF]	Descripción	[REF]	Descripción	[REF]	Descripción		
2123-4	Muestra de glándula suprarrenal de primate, 4 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2279	Control positivo anticuerpos suprarrenales	1:4	30 minutos
2124	Muestra de glándula salivar de primate, 6 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2201	Control homogéneo ANA	1:10	30 minutos
2125-4	Muestra de ovario de primate, 4 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2206	Control positivo anticuerpos células esteroideas	1:10	3 horas
2128	Muestra de cerebelo de primate, 6 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2280	Control positivo anticuerpos anti-Hu	1:10	30 minutos
2129-4	Muestra de testículo de primate, 4 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2206	Control positivo anticuerpos células esteroideas	1:10	3 horas
2134	Muestra de nervio ciático de primate, 6 pocillos	2140	IgM antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml	2209	Control positivo anticuerpos anti-MAG	1:10	30 minutos

2147	Muestra de piel de espesor parcial de primate, 6 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2213 y/o 2217	Control positivo anticuerpos intercelulares y/o control positivo anticuerpos anti-BMZ	1:10	30 minutos
2155	Muestra de esófago de primate, 4 pocillos	2100 (o 2099)	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2213 y/o 2217	Control positivo anticuerpos intercelulares y/o control positivo anticuerpos anti-BMZ	1:10	30 minutos
2156	Muestra de epitelio de transición, 6 pocillos	2100	Conjugado IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	2235	Control positivo anticuerpos Anti-PNP	1:10	30 minutos
2157	Muestra de corazón de primate, 6 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2235	Control positivo anticuerpos de músculo esquelético/corazón	1:10	30 minutos
2158	Muestra de músculo esquelético de primate, 6 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2235	Control positivo anticuerpos de músculo esquelético/corazón	1:10	30 minutos
2164	Muestra de estómago de primate, 6 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2211	Control positivo ASMA	1:10	30 minutos
2180	Muestra de tiroides de primate, 6 pocillos	2099	IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans, 5ml (adsorbido primate)	2239	Control positivo de anticuerpos microsomales/ tiroideos	1:10	30 minutos

* En todos los casos, la segunda incubación (incubación con conjugado) dura 30 minutos.

Componentes opcionales

[REF]	Descripción	U/M
2099	Conjugado IgG antihumano de cabra FITC adsorbido primate con contratinción azul de Evans	5ml
2100	Conjugado IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	5ml
2100x	Conjugado IgG antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	5ml
2100-15	Conjugado IgG antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	15ml
2100-15x	Conjugado IgG antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	15ml
2107	Conjugado IgA antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	5ml
2107x	Conjugado IgA antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	5ml
2107-15	Conjugado IgA antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	15ml
2107-15x	Conjugado IgA antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	15ml
2113	Conjugado polivalente (IgG/IgA) antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	5ml
2113x	Conjugado polivalente (IgG/IgA) antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	5ml
2113-15	Conjugado polivalente (IgG/IgA) antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	15ml
2113-15x	Conjugado polivalente (IgG/IgA) antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	15ml
2130	Conjugado polivalente (IgG/IgA/IgM) antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	5ml
2130x	Conjugado polivalente (IgG/IgA/IgM) antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	5ml
2130-15	Conjugado polivalente (IgG/IgA/IgM) antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	15ml
2130-15x	Conjugado polivalente (IgG/IgA/IgM) antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	15ml
2140	Conjugado IgM antihumano de cabra FITC con contratinción azul de Evans	5ml
2140x	Conjugado IgM antihumano de cabra FITC sin contratinción azul de Evans	5ml
2200	Control negativo IFA	0,5ml
2201	Control positivo homogéneo ANA	0,5ml

2206	Control positivo células anti-estereoideas	0,5ml
2209	Control positivo anti-MAG	0,5ml
2211	Control positivo ASMA	0,5ml
2213	Control positivo anti-IC	0,5ml
2213-1	Control titulación baja IC	0,5ml
2214	Control positivo anti-IC (*pemphigus vulgaris*)	0,5ml
2216	Control positivo anti-IC (*pemphigus foliaceus*)	0,5ml
2217	Control positivo anti-BMZ (*pemphigoid*)	0,5ml
2235	Control positivo anticuerpos anti-músculo esquelético/corazón	0,5ml
2239	Control positivo anticuerpos anti-microsomales/tiroideos	0,5ml
2279	Control positivo anti-suprarrenal	0,5ml
2280	Control positivo anti-Hu	0,5ml
2301	PBS	para 1 litro
2302	Diluyente de muestra	60ml
2500	Lámina para cubrir muestras de microscopio (24x60mm)	caja de 12
2505	Vial cuentagotas mediano	5ml
2510	Contratinción azul de Evans	1,0ml

Símbolos utilizados en las etiquetas:

[LOT] Número de lote

[REF] Número de catálogo

e Utilizar antes de

t Temperatura de almacenamiento

! Leer las instrucciones antes de utilizar

[IVD] Utilización diagnóstica in vitro

Fabricante

S Número de análisis

Material necesario pero no suministrado

- Microscopio de fluorescencia
- Micropipeta o pipeta Pasteur
- Pipetas serológicas
- Cubeta para tinción (por ejemplo, cubeta Coplin)
- Tubos de ensayo pequeños (por ejemplo, de 13 x 75 mm) y rejilla para tubos de ensayo
- Agua destilada o desionizada
- 1 recipiente de 1 litro
- Frasco de lavado
- Toallitas de papel
- Cámara de incubación

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para utilización diagnóstica *in vitro*. Todos los componentes provenientes de seres humanos utilizados han sido analizados en busca de HBsAg, HCV, HIV-1 y 2 y HTLV-I y han dado negativo de acuerdo con los exámenes necesarios de la FDA. Todos los especímenes de suero humano y productos derivados de los seres humanos deberían ser tratados como potencialmente peligrosos, independientemente de su origen. Siga unas buenas prácticas de laboratorio a la hora de guardar, preparar y desechar estos materiales.[2]

ADVERTENCIA – La azida sódica (NaN3) puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Al eliminar líquidos, enjuáguelos con grandes cantidades de agua para evitar la acumulación de azida. La azida de sodio puede ser tóxica por ingestión. En caso de ser ingerida, informe del incidente inmediatamente al director del laboratorio o al servicio de toxicología.

RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE ESPECIMENES

En este procedimiento sólo deberían utilizarse especimenes de suero. Los especimenes muy hemolizados, lipémicos o contaminados microbiológicamente pueden afectar al funcionamiento del análisis y no deberían ser utilizados. Guarde los especimenes entre 2°C y 8°C durante un máximo de una semana. Para periodos de almacenamiento más prolongados, el suero debería ser congelado a -20ºC. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente.

PROCEDIMIENTO

Método de análisis

A. Reconocimiento

1. Diluya cada muestra de suero del paciente con el Diluyente Tamponado siguiendo las cantidades de dilución recomendadas en la sección Materiales proporcionados. 1:4 (0,1 ml suero + 0,3 ml diluyente) o 1:10 (10 µl suero

+ 90 µl diluyente). No diluya los Controles Positivos o Negativos que va a utilizar. Guarde el suero no diluido para determinar las titulaciones de los anticuerpos si los análisis de reconocimiento dan positivo.

2. Deje que las bolsas con las muestras de sustrato se equilibren con la temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Saque las muestras con cuidado sin tocar el sustrato.
3. Etiquete las muestras y colóquelas en una cámara de incubación recubierta de toallitas de papel humedecidas con agua para evitar que se sequen.
4. Invierta el vial cuentagotas y apriételo suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 µl) del Control Negativo en el pocillo n.º 1. Si procede, aplique 1 gota de Control Positivo en el pocillo n.º 2. Evite llenar demasiado los pocillos.
5. Con una micropipeta o una pipeta Pasteur, aplique 1 gota de suero diluido del paciente (aproximadamente 50 µl) en el resto de pocillos. Evite llenar demasiado los pocillos.
6. Tape la cámara de incubación e incube las muestras a temperatura ambiente en función del tiempo de incubación de muestras recomendado en la sección Materiales proporcionados.
7. Saque una muestra de la cámara de incubación. Sujete la muestra por un extremo y enjuáguela cuidadosamente con aproximadamente 10 ml de PBS utilizando una pipeta, o enjuague la pipeta en un vaso de precipitados lleno de PBS. No utilice el frasco de lavado. Pase la muestra inmediatamente a la cubeta Coplin y déjela en en ella durante 10 minutos. Repita este proceso con las muestras siguientes.
8. Saque las muestras de la cubeta Coplin. Seque el extremo de la muestra con una toallita de papel para retirar el exceso de PBS. Meta la muestra en la cámara de incubación. Invierta inmediatamente el vial cuentagotas de Conjugado y apriételo suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 µl) en cada pocillo.
9. Repita los pasos **7 y 8** para cada una de las muestras.
10. Vuelva a tapar la cámara de incubación. Incube la muestra **30 minutos** a temperatura ambiente.
11. Saque la muestra de la incubadora. Sujete la muestra por un extremo y métala en un vaso de precipitados con PBS para retirar el exceso de conjugado. Coloque las muestras en una cubeta para tinción llena de PBS durante 10 minutos. Si utiliza conjugado opcional sin contratinción (consulte los componentes opcionales dentro de la sección Materiales proporcionados), puede añadir 2-3 gotas de contratinción azul de Evans en la inmersión final. Repita la operación para las muestras restantes. NOTA: Si no sumerge las muestras adecuadamente podría existir un aumento de la fluorescencia de fondo.
12. Saque una muestra de la cubeta de tinción. Seque el extremo de la muestra con una toallita de papel para retirar el exceso de PBS. **Para que la muestra no se seque, proceda inmediatamente con el paso siguiente mientras esté todavía húmeda.**
13. Coloque la lámina para cubrir la muestra aplicando **3 gotas** de Medio de Montaje homogéneamente y coloque la lámina sobre la muestra. Evite presionar demasiado la lámina y moverla hacia los lados.
14. Repita los pasos **12 y 13** para cada una de las muestras.
15. Examine la fluorescencia específica bajo un microscopio de fluorescencia con una aumento de 200x o superior. Las muestras pueden ser estudiadas nada más prepararlas. Sin embargo, gracias a la presencia de agente antidebilitamiento en el medio de montaje, no se perderá demasiada intensidad en la tinción si estudia la muestra hasta 48 horas más tarde. Las muestras deberían guardarse en un lugar oscuro a 2-8ºC.

B. Determinación final (titulación)

Un suero que ha dado positivo en el análisis de reconocimiento puede volver a ser analizado siguiendo los pasos 5 a 13 para determinar su titulación. Realice diluciones dobles en serie empezando con la dilución de reconocimiento inicial. El recíproco de la dilución más elevada que dé una reacción positiva es la titulación. A continuación se incluyen tablas para las diluciones de reconocimiento estándar:

Preparación de diluciones en serie empezando por 1:4

Numere seis tubos del 1 al 6. Añada 0,3 ml de Diluyente de Muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 6. Aplique 0,1 ml de suero sin diluir en el tubo 1 y mézclelo bien. Transfiera 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mézclelo bien. Siga transfiriendo 0,2 ml de un tubo a otro después de mezclarlo para conseguir las diluciones que aparecen en la tabla siguiente:

Tubos	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Suero	0,1 ml +					
Diluyente tamponado	0,3 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Preparación de diluciones en serie empezando por 1:10

Numere seis tubos del 1 al 6. Añada 0,9 ml de Diluyente de Muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 6. Aplique 0,1 ml de suero sin diluir en el tubo 1 y mézclelo bien. Transfiera 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mézclelo bien. Siga transfiriendo 0,2 ml de un tubo a otro después de mezclarlo para conseguir las diluciones que aparecen en la tabla siguiente:

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
		⇨	⇨	⇨	⇨	⇨
Transferencia		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.

CONTROL DE CALIDAD

Deberían incluirse un Control Positivo y un Control Negativo en cada análisis. El Control Negativo no debería mostrar una fluorescencia específica. El laboratorio debe determinar las características de rendimiento adecuadas del Control Positivo utilizado.

Si no se obtienen los resultados esperados, debería volver a realizarse el análisis. Si siguen obteniéndose resultados inadecuados con los controles, podría deberse a:

- Turbidez. Tírelo y utilice otro control.
- Problemas con el sistema óptico del microscopio de fluorescencia. Por ejemplo, una alineación inadecuada, que la bombilla esté vieja y gastada, etc.
- Se ha dejado que la muestra se seque durante el procedimiento.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia suelen ser negativos con una titulación inferior que la dilución de reconocimiento, positivos con una titulación superior o igual que la dilución de reconocimiento o, preferiblemente, positivos con una titulación final específica. Los laboratorios deben validar los protocolos de uso de estos materiales y formar a sus técnicos para buscar patrones de fluorescencia específicos adecuados para los materiales utilizados y los análisis realizados.

LIMITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Los resultados de todos los análisis de inmunofluorescencia indirecta positivos así como los resultados de otros análisis de laboratorio y el estado clínico del paciente al realizar un diagnóstico.

DE

Allgemeines Immunfluoreszenzassay-Verfahren

PRODUKTBEILAGE

VERWENDUNGSZWECK
Die im Abschnitt „Material“ aufgelisteten Komponenten können für die Erfassung von Antikörpern im Humanserum durch die indirekte Immunfluoreszenz verwendet werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG
Diese Gebrauchsanweisung stellt ein allgemeines Protokoll für die Verwendung von Substrat-Objektträgern und Konjugaten, die für indirekte Immunfluoreszenzstudien geeignet sind, bereit. Autoantikörper können auf einer Vielzahl von Gewebeschnitt- und Zellkultur-Substraten sichtbar gemacht werden, indem man ein FITC-Konjugatsystem verwendet. Der Grundsatz des Verfahrens wird im folgenden Abschnitt beschrieben. Individuelle Labors können diese Produktbeilage als ein Leitfaden verwenden, sollten aber eine interne Validierung von internen Protokollen durchführen, die diese Materialien verwenden.

GRUNDSÄTZE DES VERFAHRENS
Die in den „Materialien“ aufgelisteten Komponenten können bei indirekten Immunfluoreszenz-Protokollen verwendet werden. In solch einem Protokoll werden Patientenseren auf einem Substrat-Objektträger inkubiert, um das Binden von Antikörpern zu ermöglichen. Alle nicht gebundenen Antikörper werden durch Spülen entfernt. Gebundene Antikörper der IgA-, IgG- und/oder IgM-Klasse, wie durch das verwendete Konjugat bestimmt, werden durch die Inkubation des Substrats mit dem Fluorescein-markierten, anti-menschlichen Konjugat erfasst. Die Reaktionen werden unter einem mit geeigneten Filtern ausgerüsteten Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Das Vorhandensein von Antikörpern kann man durch eine apfelgrüne Fluoreszenz von spezifischen histologischen Strukturen im Substrat demonstrieren. Der Titer kann durch die serielle Verdünnung der Probe bestimmt werden. Der reziproke Wert der höchsten Verdünnung, der eine positive Reaktion ergibt, ist der Titer.[1]

PRODUKTINFORMATION
Lagerung und Vorbereitung
Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. Die Reagenzien sind nach der Äquilibrierung auf Raumtemperatur gebrauchsfertig.

Materialien
Diese Anweisungen werden für die Verwendung mit Einzelkomponenten einschließlich der unten aufgelisteten Produkt-Codes bereitgestellt. Die Substrat-Objektträger sind neben dem Konjugat aufgelistet, das für die Erfassung von Autoantikörpern auf dem speziellen Substrat geeignet ist.

Substrat-Objektträger		Konjugat		Positivkontrolle		Probenverdünnung	Probeninkubationszeit*
[REF]	Beschreibung	[REF]	Beschreibung	[REF]	Beschreibung		
2123-4	Primatennebennieren-Objektträger, 4 Vertiefungen	2099	Ziege anti-menschliches IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau, 5ml (primatenabsorbiert)	2279	Nebennieren-antikörper-Positivkontrolle	1:4	30 Minuten
2124	Primatenspeicheldrüsen-Objektträger, 6 Vertiefungen	2099	Ziege anti-menschliches IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau, 5ml (primatenabsorbiert)	2201	ANA, Homogene Kontrolle	1:10	30 Minuten
2125-4	Primateneierstock-Objektträger, 4 Vertiefungen	2099	Ziege anti-menschliches IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau, 5ml (primatenabsorbiert)	2206	Steroidale Zellen-Antikörper-Positivkontrolle	1:10	3 Stunden
2128	Primatenkleinhirn-Objektträger, 6 Vertiefungen	2099	Ziege anti-menschliches IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau, 5ml (primatenabsorbiert)	2280	Hu-Antikörper-Positivkontrolle	1:10	30 Minuten
2129-4	Primatenhoden-Objektträger, 4 Vertiefungen	2099	Ziege anti-menschliches IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau, 5ml (primatenabsorbiert)	2206	Steroidale Zellen-Antikörper-Positivkontrolle	1:10	3 Stunden
2134	Primatenhüftnerv-Objektträger, 6 Vertiefungen	2140	Ziege antimenschlicher IgM FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau, 5ml	2209	MAG-Antikörper-Positivkontrolle	1:10	30 Minuten

2147	Primatenspalthaut-Objektträger, 6 Vertiefungen	2099	Ziege anti-menschliches IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau, 5ml (primatenabsorbiert)	2213 und/oder 2217	Interzelluläre Antikörper-Positivkontrolle und/oder BMZ-Antikörper-Positivkontrolle	1:10	30 Minuten
2155	Primatenösophagus-Objektträger, 4 Vertiefungen	2100 (oder 2099)	Ziege anti-menschliches IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau, 5ml (primatenabsorbiert)	2213 und/oder 2217	Interzelluläre Antikörper-Positivkontrolle und/oder BMZ-Antikörper-Positivkontrolle	1:10	30 Minuten
2156	overgangs-epitheel-Objektträger 6 Vertiefungen	2100	Ziege anti-menschliches IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau	2241	PNP Antikörper-Positivkontrolle	1:10	30 Minuten
2157	Primatenherzmuskel-Objektträger, 6 Vertiefungen	2099	Ziege anti-menschliches IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau, 5ml (primatenabsorbiert)	2235	Herz-/Skelettmuskel-Antikörper-Positivkontrolle	1:10	30 Minuten
2158	Primatenskelettmuskel-Objektträger, 6 Vertiefungen	2099	Ziege anti-menschliches IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau, 5ml (primatenabsorbiert)	2235	Herz-/Skelettmuskel-Antikörper-Positivkontrolle	1:10	30 Minuten
2164	Primatenbauch-Objektträger, 6 Vertiefungen	2099	Ziege anti-menschliches IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau, 5ml (primatenabsorbiert)	2211	ASMA-Positivkontrolle	1:10	30 Minuten
2180	Primatenschilddrüsen-Objektträger, 6 Vertiefungen	2099	Ziege anti-menschliches IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau, 5ml (primatenabsorbiert)	2239	Schilddrüsen-/Mikrosomen-Antikörper-Positivkontrolle	1:10	30 Minuten

* Die zweite Inkubation (Konjugatinkubation) beträgt bei allen Fällen 30 Minuten.

Optionale Komponenten

[REF]	Beschreibung	U/M
2099	Primatenabsorbierte Ziege anti-menschlicher IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau	5 ml
2100	Ziege anti-menschliches IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau	5 ml
2100x	Ziege anti-menschliches IgG FITC ohne Gegenfarbstoff Evans Blau	5 ml
2100-15	Ziege anti-menschliches IgG FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau	15 ml
2100-15x	Ziege anti-menschliches IgG FITC ohne Gegenfarbstoff Evans Blau	15 ml
2107	Ziege anti-menschliches IgA FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau	5 ml
2107x	Ziege anti-menschliches IgA FITC ohne Gegenfarbstoff Evans Blau	5 ml
2107-15	Ziege anti-menschliches IgA FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau	15 ml
2107-15x	Ziege anti-menschliches IgA FITC ohne Gegenfarbstoff Evans Blau	15 ml
2113	Ziege anti-menschliches polyvalentes FITC (IgG/IgA) mit Gegenfarbstoff Evans Blau	5 ml
2113x	Ziege anti-menschliches polyvalentes FITC (IgG/IgA) ohne Gegenfarbstoff Evans Blau	5 ml
2113-15	Ziege anti-menschliches polyvalentes FITC (IgG/IgA) mit Gegenfarbstoff Evans Blau	15 ml
2113-15x	Ziege anti-menschliches polyvalentes FITC (IgG/IgA) ohne Gegenfarbstoff Evans Blau	15 ml
2130	Ziege anti-menschliches polyvalentes FITC (IgG/IgA/IgM) mit Gegenfarbstoff Evans Blau	5 ml
2130x	Ziege anti-menschliches polyvalentes FITC (IgG/IgA/IgM) ohne Gegenfarbstoff Evans Blau	5 ml
2130-15	Ziege anti-menschliches polyvalentes FITC (IgG/IgA/IgM) mit Gegenfarbstoff Evans Blau	15 ml
2130-15x	Ziege anti-menschliches polyvalentes FITC (IgG/IgA/IgM) ohne Gegenfarbstoff Evans Blau	15 ml
2140	Ziege anti-menschliches IgM FITC mit Gegenfarbstoff Evans Blau	5 ml
2140x	Ziege anti-menschliches IgM FITC ohne Gegenfarbstoff Evans Blau	5 ml
2200	IFA-Negativkontrolle	0,5 ml
2201	ANA Homogene Positivkontrolle	0,5 ml
2206	antisteroidale Zellen-Positivkontrolle	0,5 ml
2209	Anti-MAG-Positivkontrolle	0,5 ml
2211	ASMA-Positivkontrolle	0,5 ml
2213	Anti-IC-Positivkontrolle	0,5 ml
2213-1	IC niedrige Titer-Kontrolle	0,5 ml

2214	Anti-IC-Positivkontrolle (Pemphigus vulgaris)	0,5 ml
2216	Anti-IC-Positivkontrolle (Pemphigus foliaceus)	0,5 ml
2217	Anti-BMZ-Positivkontrolle (Pemphigoid)	0,5 ml
2235	Anti-Herz-/ Skelettmuskel-Positivkontrolle	0,5 ml
2239	Anti-Thyroid-/Mikrosomen-Positivkontrolle	0,5 ml
2279	Anti-Nebennieren-Positivkontrolle	0,5 ml
2280	Anti-Hu-Positivkontrolle	0,5 ml
2301	PBS	für 1 Liter
2302	Probenverdünnungsmittel	60 ml
2500	Objektträger-Deckglas (24x60 mm)	Kästchen mit 12
2505	Eindeckmedium-Tropffläschchen	5 ml
2510	Gegenfarbstoff Evans Blau	1,0 ml

Auf Etiketten verwendete Symbole

[LOT] Chargennummer

[REF] Katalognummer

[IVD] In vitro diagnostischer Gebrauch

e Verwenden bei

t Lagertemperatur

! Die Anleitung vor dem Gebrauch durchlesen

S Anzahl an Tests

Hersteller

Erforderliche aber nicht bereitgestellte Materialien
- Fluoreszenzmikroskop
- Mikropipette oder Pasteurpipette
- serologische Pipetten
- Färbekasten (z. B. Coplin-Becher)
- kleine Reagenzgläser (z. B. 13 x 75 mm) und Reagenzglasgestell
- destilliertes oder entsalztes Wasser
- Behälter für 1 Liter
- Spritzflasche
- Papierhandtücher
- Inkubationskammer

WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN
Für *in vitro* diagnostischen Gebrauch. Alle verwendeten menschlichen Komponenten sind auf HbsAg, HCV, HIV 1 und 2 und HTLV-I geprüft und durch erforderliche Tests anhand FDA als negativ festgestellt worden. Alle Humanserumproben und menschlichen Produkte sollten unabhängig von ihrer Herkunft als potenziell gefährlich behandelt werden. Gute Laborpraktiken bei der Lagerung, beim Abgeben und dem Entsorgen dieser Materialien befolgen.[2]
WARNUNG - Natriumazid (NaN3) kann mit Blei- und Kupferleitungen reagieren und hoch explosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung von Flüssigkeiten mit großen Mengen an Wasser spülen, um eine Azid-Ansammlung zu verhindern. Natriumazid kann giftig sein, wenn es aufgenommen wird. Bei Aufnahme den Zwischenfall unmittelbar dem Labordirektor oder einem Giftnotrufzentrum berichten.

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG
Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Äußerst hämolysierte, lipämisch oder mikrobisch verunreinigte Proben können die Leistung dieses Tests beeinträchtigen und sollten nicht verwendet werden. Die Proben bei 2- 8 °C für nicht länger als eine Woche lagern. Bei längerer Lagerung sollte das Serum bei -20 °C eingefroren werden. Das wiederholte Einfrieren und Auftauen von Proben vermeiden.

VERFAHREN
Prüfmethode
A. Screening
1. Jedes Patientenserum mit dem gepufferten Verdünnungsmittel gemäß der empfohlenen Verdünnung im Abschnitt Bereitgestellte Materialien verdünnen. 1:4 (0,1 ml Serum + 0,3 ml Verdünnungsmittel) oder 1:10 (10 µl Serum + 90 µl Verdünnungsmittel). Die zu verwendenden Positiv- oder Negativkontrollen nicht verdünnen. Die unverdünnten Seren speichern, um Antikörpertiter zu bestimmen, wenn Screening-Tests sich als positiv erweisen.
2. Die Substrat-Objektträger enthaltenden Beutel bei Raumtemperatur für 10-15 Minuten ins Gleichgewicht bringen. Die Objektträger sorgfältig entfernen, ohne das Substrat zu berühren.
3. Die Objektträger etikettieren und sie in einer Inkubationskammer zusammen mit mit Wasser angefeuchteten Papierhandtüchern platzieren, um ein Trocknen zu verhindern.

4. Das Tropffläschchen umdrehen und sanft pressen, um 1 Tropfen (etwa 50 µl) der Negativkontrolle in Vertiefung #1 zu geben. Wenn zutreffend, 1 Tropfen der Positivkontrolle in Vertiefung #2 geben. Das Überfüllen der Vertiefungen vermeiden.
5. Mit einer Mikropipette oder Pasteurpipette 1 Tropfen des verdünnten Patientenserums (etwa 50 µl) in die anderen Vertiefungen geben. Das Überfüllen der Vertiefungen vermeiden.
6. Den Deckel auf die Inkubationskammer platzieren und die Objektträger bei Raumtemperatur gemäß der im Abschnitt Bereitgestellte Materialien empfohlenen Probeninkubationszeit inkubieren.
7. Einen Objektträger aus der Inkubationskammer entfernen. Den Objektträger am Laschenende halten und sanft mit etwa 10 ml PBS unter Verwendung einer Pipette spülen oder im mit PBS gefüllten Becher spülen. Keine Spritzflasche verwenden. Den Objektträger unmittelbar in den Coplin-Becher übertragen und 10 Minuten waschen. Den Vorgang mit allen verbleibenden Objektträgern wiederholen.
8. Objektträger aus dem Coplin-Becher entnehmen. Die Kante des Objektträgers auf einem Papierhandtuch blotten, um übermäßiges PBS zu entfernen. Den Objektträger in die Inkubationskammer legen. Unmittelbar das Konjugat-Tropffläschchen umdrehen und sanft pressen, um 1 Tropfen (etwa 50 µl) in jede Vertiefung zu geben.
9. Die Schritte **7 und 8** für jeden Objektträger wiederholen.
10. Den Deckel wieder auf die Inkubationskammer aufsetzen. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Einen Objektträger aus dem Inkubator entnehmen. Den Objektträger am Laschenende halten und in einen Becher, der PBS enthält, eintauchen, um überzähliges Konjugat zu entfernen. Den/die Objektträger für 10 Minuten in einen Färbekasten mit PBS geben. Wenn optionales Konjugat ohne Gegenfarbstoff verwendet wird (siehe optionale Komponenten im Abschnitt Bereitgestellte Materialien), können 2-3 Tropfen Gegenfarbstoff Evans Blau zum endgültigen Waschen hinzugefügt werden. Dies für die verbleibenden Objektträger wiederholen. HINWEIS: Falsches Waschen kann zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz führen.
12. Einen Objektträger aus dem Färbekasten entnehmen. Die Kante des Objektträgers auf einem Papierhandtuch blotten, um übermäßiges PBS zu entfernen. **Um zu verhindern, dass der Objektträger trocknet, unmittelbar mit dem nächsten Schritt fortfahren, während der Objektträger immer noch nass ist.**
13. Das Deckglas aufbringen, indem **3 Tropfen** des Eindeckmediums gleichmäßig auf dem Deckglas verteilt werden und das Deckglas über dem Objektträger platziert wird. Übermäßige Druckausübung und eine seitliche Bewegung des Deckglases vermeiden.
14. Die Schritte 12 und 13 für jeden Objektträger wiederholen.
15. Die spezifische Fluoreszenz unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Vergrößerung von 200x oder größer überprüfen.
    Die Objektträger können abgelesen werden sobald sie vorbereitet sind. Durch das Vorhandensein von Schwundausgleichmittel im Eindeckmedium tritt jedoch kein bedeutender Verlust der Färbeintensität auf, wenn das Ablesen bis zu 48 Stunden verzögert wird. Die Objektträger sollten im Dunkeln bei 2-8 °C gelagert werden.

B. Endpunktbestimmung (Titration)
Ein beim Screening-Test positives Serum kann weiter getestet werden, indem den Schritten 5 bis 13 gefolgt wird, um den Titer zu bestimmen. Zweifache serielle Verdünnungen durchführen, indem mit der anfänglichen Screening-Verdünnung begonnen wird. Der reziproke Wert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion produziert, ist der Titer. Tabellen für Standard-Screening-Verdünnungen sind nachfolgend aufgeführt:

Vorbereitung von seriellen Verdünnungen beginnend bei 1:4
Sechs Reagenzgläser von 1 bis 6 nummerieren, 0,3 ml des Proben-Verdünnungsmittels in Reagenzglas 1 und 0,2 ml in die Reagenzgläser 2 bis 6 hinzufügen. Dann 0,1 ml des unverdünnten Serums mit der Pipette in Reagenzglas 1 geben und gründlich mischen. 0,2 ml von Reagenzglas 1 zu Reagenzglas 2 übertragen und gründlich mischen. Weiterhin 0,2 ml nach dem Mischen von einem Reagenzglas zum Nächsten übertragen, um die in der folgenden Tabelle angegebenen Verdünnungen hervorzubringen:

Reagenzglas	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Serum	0,1 ml					
	+					
Gepuffertes Verdünnungsmittel	0,3 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
Endgültige Verdünnung	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128 usw.

Vorbereitung von seriellen Verdünnungen, beginnend bei 1:10
Sechs Reagenzgläser von 1 bis 6 nummerieren, 0,9 ml des Proben-Verdünnungsmittels in Reagenzglas 1 und 0,2 ml in die Reagenzgläser 2 bis 6 hinzufügen. Dann 0,1 ml des unverdünnten Serums mit der Pipette in Reagenzglas 1 geben und gründlich mischen. 0,2 ml von Reagenzglas 1 zu Reagenzglas 2 übertragen und gründlich mischen. Weiterhin 0,2 ml nach dem Mischen von einem Reagenzglas zum Nächsten übertragen, um die in der folgenden Tabelle angegebenen Verdünnungen hervorzubringen:

Reagenzglas	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Serum	0,1 ml					
	+					
Gepuffertes						

Verdünnungsmittel	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
Endgültige Verdünnung	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 usw.

Qualitätskontrolle
Sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle sollten in jedem Testdurchgang enthalten sein. Die Negativkontrolle sollte keine spezifische Fluoreszenz zeigen. Das Labor muss die geeigneten Leistungseigenschaften der verwendeten Positivkontrolle bestimmen.
Wenn die erwarteten Resultate nicht erhalten werden, sollte der Durchgang wiederholt werden. Wenn weiterhin unzureichende Resultate bei den Kontrollen auftreten, kann Folgendes der Grund dafür sein:

- Trübheit. Wegwerfen und eine andere Kontrolle verwenden.
- Probleme mit dem optischen System des Fluoreszenzmikroskops. Diese können falsches Ausrichten, eine Glühlampe, welche die zu erwartende Gebrauchsdauer überschritten hat, usw einschließen.
- Zulassen, dass der Objektträger während des Verfahrens trocknet.

AUSDEUTUNG VON RESULTATEN
Die Immunfluoreszenzassay-Resultate werden generell als negativ mit einem Titer kleiner als die Screening-Verdünnung, positiv mit einem Titer größer oder gleich der Screening-Verdünnung oder vorzugsweise positiv mit dem spezifischen Endpunkt-Titer berichtet. Labors müssen Protokolle für die Verwendung dieser Materialien validieren und Techniker ausbilden, spezifische Fluoreszenzmuster, die für die verwendeten Materialien und die durchgeführten Tests geeignet sind, abzulesen.

BEGRENZUNG DES VERFAHRENS
Resultate aller positiven indirekten Immunfluoreszenztests zusammen mit den Resultaten anderer Labortests und dem klinischen Zustand des Patienten, wenn eine Diagnose gestellt wird.

Méthode Générale de Dosage pour Immunofluorescence

DESCRIPTION DU PRODUIT

UTILISATION VISÉE
Les composants listés dans la section "Matériel" peuvent être utilisés pour la détection d'anticorps dans le sérum humain par immunofluorescence indirecte.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION
Ces instructions d'utilisation fournissent un protocole général pour l'utilisation des porte-objets de substrats et des conjugués appropriés pour les analyses d'immunofluorescence indirecte. Les anticorps peuvent être visualisés sur une variété de sections de tissus et de substrats de culture de cellules en utilisant un système de conjugué de FITC. Le principe de la procédure est décrit dans la section suivante. Les laboratoires individuels peuvent utiliser ce descriptif de produit comme guide mais doivent réaliser une validation interne des protocoles internes en utilisant ce matériel.

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE
Les composants listés dans la section "Matériel" peuvent être utilisés pour les protocoles d'immunofluorescence indirecte. Dans le cadre d'un tel protocole, les sera de patients seront incubés sur un porte-objet de substrat pour permettre l'association d'anticorps. Tous les anticorps qui ne sont pas associés seront éliminés par rinçage. Les anticorps associés de la classe IgA, IgG et/ou IgM, tels qu'ils sont déterminés par le conjugué utilisé, sont détectés par incubation du substrat avec un conjugué anti-humain marqué de fluorescéine. Les réactions sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. La présence d'anticorps peut être démontrée par une fluorescence de couleur vert pomme des structures histologiques spécifiques contenues dans le substrat. Le titre peut être déterminé par une dilution en série du spécimen. La valeur réciproque de la dilution la plus élevée fournissant une réaction positive est le titre.[1]

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT
Stockage et préparation
Stocker tous les réactifs entre 2 et 8°C. Les réactifs sont prêts à être utilisés après avoir été amenés à température ambiante.

Matériel
Ces instructions sont fournies pour une utilisation avec des composants individuels, y compris les codes de produits listés ci-dessous. Les porte-objets sont listés à côté du conjugué approprié pour la détection des anticorps sur le substrat spécifique.

Porte-objet		Conjugué		Contrôle Positif		Dilution de Spécimen	Temps d'Incubation de l'Échantillon*
[REF]	Description	[REF]	Description	[REF]	Description		
2123-4	Porte-objet de Glande Surrénale de Primate, 4 puits	2099	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec bleu d'Evans, 5ml (adsorbé primate)	2279	Contrôle Positif Anticorps Anti surrénale	1:4	30 minutes
2124	Porte-objet de Glande Salivaire de Primate, 6 puits	2099	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec bleu d'Evans, 5ml (adsorbé primate)	2201	Contrôle Homogène ANA	1:10	30 minutes
2125-4	Porte-objet d'Ovaire de Primate, 4 puits	2099	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec bleu d'Evans, 5ml (adsorbé primate)	2206	Contrôle Positif d'Anticorps de Cellule Stéroïde	1:10	3 heures
2128	Porte-objet de Cervelet de Primate, 6 puits	2099	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec bleu d'Evans, 5ml (adsorbé primate)	2280	Contrôle Positif Anticorps Hu	1:10	30 minutes
2129-4	Porte-objet de Testicule de Primate, 4 puits	2099	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec bleu d'Evans, 5ml (adsorbé primate)	2206	Contrôle Positif d'Anticorps de Cellule Stéroïde	1:10	3 heures
2134	Porte-objet de Nerf Sciatique de Primate, 6 puits	2140	Anticorps anti-IgM humaine couplé à la FITC de Chèvre avec bleu d'Evans, 5ml	2209	Contrôle Positif Anticorps MAG	1:10	30 minutes
2147	Porte-objet de Peau de Primate, 6 puits	2099	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec bleu d'Evans, 5ml (adsorbé primate)	2213 et/ou 2217	Contrôle Positif Anticorps Intercellulaire et/ou Contrôle	1:10	30 minutes

					Positif Anticorps BMZ		
2155	Porte-objets d'œsophage de Primate	2100 (ou 2199)	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec bleu d'Evans, 5ml (adsorbé primate)	2213 et/ou 2217	Contrôle Positif Anticorps Intercellulaire et/ou Contrôle Positif Anticorps BMZ	1:10	30 minutes
2156	Porte-objets d'épithélium de transition	2100	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec contre-colorant bleu d'Evans	2241	Contrôle Positif PNP	1 :10	30 minutes
2157	Porte-objet de Muscle de Cœur, 6 puits	2099	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec bleu d'Evans, 5ml (adsorbé primate)	2235	Contrôle Positif Anticorps Muscle de Cœur / Squelette	1:10	30 minutes
2158	Porte-objet de Muscle de Squelette de Primate, 6 puits	2099	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec bleu d'Evans, 5ml (adsorbé primate)	2235	Contrôle Positif Anticorps Muscle de Cœur / Squelette	1:10	30 minutes
2164	Porte-objet d'Estomac de Primate, 6 puits	2099	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec bleu d'Evans, 5ml (adsorbé primate)	2211	Contrôle Positif ASMA	1:10	30 minutes
2180	Porte-objet de Thyroïde de Primate, 6 puits	2099	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec bleu d'Evans, 5ml (adsorbé primate)	2239	Contrôle Positif Anticorps de Thyroïde / Microsomal	1:10	30 minutes

* La seconde incubation (incubation de conjugué) est de 30 minutes dans tous les cas.

Composants Optionnels

[REF]	Description	U/M
2099	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec contre-colorant bleu d'Evans adsorbé primate	5ml
2100	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec contre-colorant bleu d'Evans	5ml
2100x	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre sans contre-colorant bleu d'Evans	5ml
2100-15	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre avec contre-colorant bleu d'Evans	15ml
2100-15x	Anticorps anti-IgG humaine couplé à la FITC de Chèvre sans contre-colorant bleu d'Evans	15ml
2107	Anticorps anti-IgA humaine couplé à la FITC de Chèvre avec contre-colorant bleu d'Evans	5ml
2107x	Anticorps anti-IgA humaine couplé à la FITC de Chèvre sans contre-colorant bleu d'Evans	5ml
2107-15	Anticorps anti-IgA humaine couplé à la FITC de Chèvre avec contre-colorant bleu d'Evans	15ml
2107-15x	Anticorps anti-IgA humaine couplé à la FITC de Chèvre sans contre-colorant bleu d'Evans	15ml
2113	Anticorps anti-humain polyvalent (IgG/IgA) couplé à la FITC de Chèvre avec contre-colorant bleu d'Evans	5ml
2113x	Anticorps anti-humain polyvalent (IgG/IgA) couplé à la FITC de Chèvre sans contre-colorant bleu d'Evans	5ml
2113-15	Anticorps anti-humain polyvalent (IgG/IgA) couplé à la FITC de Chèvre avec contre-colorant bleu d'Evans	15ml
2113-15x	Anticorps anti-humain polyvalent (IgG/IgA) couplé à la FITC de Chèvre sans contre-colorant bleu d'Evans	15ml
2130	Anticorps anti-humain polyvalent (IgG/IgA/IgM) couplé à la FITC de Chèvre avec contre-colorant bleu d'Evans	5ml
2130x	Anticorps anti-humain polyvalent (IgG/IgA/IgM) couplé à la FITC de Chèvre sans contre-colorant bleu d'Evans	5ml
2130-15	Anticorps anti-humain polyvalent (IgG/IgA/IgM) couplé à la FITC de Chèvre avec contre-colorant bleu d'Evans	15ml
2130-15x	Anticorps anti-humain polyvalent (IgG/IgA/IgM) couplé à la FITC de Chèvre sans contre-colorant bleu d'Evans	15ml
2140	Anticorps anti-IgM humaine couplé à la FITC de Chèvre avec contre-colorant bleu d'Evans	5ml
2140x	Anticorps anti-IgM humaine couplé à la FITC de Chèvre sans contre-colorant bleu d'Evans	5ml
2200	Contrôle Négatif IFA	0.5ml
2201	Contrôle Positif Homogène ANA	0.5ml
2206	Contrôle Positif Cellule anti Stéroïde	0.5ml
2209	Contrôle Positif anti-MAG	0.5ml

2211	Contrôle Positif ASMA	0.5ml
2213	Contrôle Positif anti-IC	0.5ml
2213-1	Contrôle Tiers Inférieur IC	0.5ml
2214	Contrôle Positif anti-IC (*pemphigus vulgaris*)	0.5ml
2216	Contrôle Positif anti-IC (*pemphigus foliaceus*)	0.5ml
2217	Contrôle Positif anti-BMZ (pemphigoïde)	0.5ml
2235	Contrôle Positif Muscle Cœur/Squelette	0.5ml
2239	Contrôle Positif anti Thyroïde/Microsomal	0.5ml
2279	Contrôle Positif anti Surrénale	0.5ml
2280	Contrôle Positif anti-Hu	0.5ml
2301	PBS	pour 1 litre
2302	Diluant pour Échantillon	60ml
2500	Lamelle couvre-objet pour Porte-objet de Microscope (24x60mm)	boîte de 12
2505	Fiole Compte-Gouttes pour Milieu de Montage	5ml
2510	Contre-colorant Bleu d'Evans	1.0ml

Symboles utilisés sur les étiquettes :

[LOT]	Numéro de lot
[REF]	Numéro Catalogue
e	Utiliser avant
t	Température de stockage
!	Lire les instructions d'utilisation
[IVD]	Utilisation pour un diagnostic in vitro
	Fabricant
S	Nombre de Tests

Matériel requis mais non fourni
- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur
- Pipettes sérologiques
- Cuve à coloration (p. ex. bocal Coplin)
- Petits tubes à essai (p. ex. 13 x 75 mm) et support pour tubes à essai
- Eau distillée ou déionisée
- Récipient d'un litre
- Flacon laveur
- Serviettes en papier
- Chambre d'incubation

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS
Pour Utilisation en Diagnostic *in vitro.* Tous les éléments dérivés du corps humain utilisés ont été testés pour les virus HbsAg, HCV, HIV-1 et 2 et HTLV-1 et le résultat des tests était négatif, conformément aux exigences de la FDA. Tous les spécimens de sérum humain et les produits dérivés du corps humain sont traités comme potentiellement dangereux, quelle que soit leur origine. Veuillez suivre les bonnes pratiques de laboratoire lors du stockage, de la délivrance et de l'élimination de ces matériaux.[2]
AVERTISSEMENT - L'azoture de sodium (NaN3) peut réagir avec la tuyauterie en plomb ou en cuivre et former des azotures métalliques explosifs. Lors de l'élimination des liquides, jetez-les avec une quantité importante d'eau pour éviter l'accumulation d'azotures. L'azoture de sodium peut être toxique s'il est ingéré. En cas d'ingestion, veuillez en informer immédiatement votre directeur de laboratoire ou votre centre antipoison.

COLLECTE DES SPÉCIMENS ET PRÉPARATION
Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés pour cette procédure. L'emploi d'échantillons hémolysés, nettement lipémiques ou contaminés par des microbes peut interférer avec la réalisation du test et ceux-ci ne doivent pas être utilisés. Conserver les spécimens à 2°-8°C pendant une période inférieure à une semaine. Pour une conservation pendant une période plus longue, le sérum doit être congelé à -20°C. Évitez la congélation et la décongélation répétée des échantillons.

PROCÉDURE
Méthode de Test
A. Dépistage
1. Diluer chaque sérum de patient avec le Diluant Tampon selon la dilution recommandée dans la section Matériel Fourni. 1:4 (0.1 ml de sérum + 0.3 ml de diluant) ou 1:10 (10 µl de sérum + 90 µl de diluant). Ne pas diluer les Contrôles Positifs et Négatifs à utiliser. Garder les sera non dilués pour déterminer les titres d'anticorps si les tests de dépistage ont des résultats positifs.
2. Laisser les pochettes contenant les porte-objets des substrats s'équilibrer à température ambiante pendant 10-15 minutes. Ôter prudemment les porte-objets sans toucher le substrat.
3. Étiqueter les porte-objets et les placer dans une chambre d'incubation où des serviettes en papier humidifiées avec de l'eau sont disposées pour prévenir le séchage.

4. Renverser la fiole compte-gouttes et la presser pour appliquer 1 goutte (environ 50 µl) du Contrôle Négatif dans le puits #1. Le cas échéant, appliquer 1 goutte de Contrôle Positif au puits #2. Éviter de trop remplir les puits.
5. En utilisant une micropipette ou une pipette Pasteur, appliquer 1 goutte du sérum de patient dilué (environ 50 µl) dans les autres puits. Éviter de trop remplir les puits.
6. Placer le couvercle sur la chambre d'incubation et laisser incuber les porte-objets à température ambiante selon le Temps d'Incubation des Échantillons recommandé dans la section Matériel Fourni.
7. Ôter un porte-objet de la chambre d'incubation. Maintenez le porte-objet par son extrémité et rincez-le délicatement avec environ 10 ml de PBS en utilisant une pipette, ou rincez le porte-objet dans vase à bec rempli de PBS. Ne pas utiliser de flacon laveur. Transférer immédiatement le porte-objet dans le bocal de Coplin et le laver pendant 10 minutes. Répéter le processus avec tous les porte-objets restants.
8. Sortir le ou les porte-objet(s) du bocal de Coplin. Sécher les extrémités du porte-objet avec une serviette en papier pour enlever l'excès de PBS. Placer le porte-objet dans la chambre d'incubation. Renverser immédiatement la fiole compte-gouttes de Conjugué et la presser délicatement pour appliquer 1 goutte (environ 50 µl) dans chaque puits.
9. Répéter les étapes **7 et 8** pour chaque porte-objet.
10. Replacer le couvercle sur la chambre d'incubation. Laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
11. Ôter le couvercle de l'incubateur. Maintenir le porte-objet par son extrémité et le tremper dans le vase à bec contenant le PBS pour enlever l'excès de conjugué. Placer le ou les porte-objet(s) dans une cuve à coloration remplie de PBS pendant 10 minutes. Si un conjugué optionnel sans contre-colorant est utilisé (voir les composants optionnels dans la Section Matériel Fourni), il est possible d'ajouter 2-3 gouttes de Bleu d'Evans au lavage final. Répéter l'opération pour les porte-objets restants. REMARQUE : Un lavage non effectué correctement peut causer une augmentation de la fluorescence de fond.
12. Enlever un porte-objet de la cuve à coloration. Sécher les extrémités du porte-objet avec une serviette en papier pour enlever l'excès de PBS. **Pour prévenir le séchage du porte-objet, passez immédiatement à l'étape suivante tant que le porte-objet est encore humide.**
13. Montez la lamelle couvre-objet en appliquant **3 gouttes** du Milieu de Montage uniformément sur la lamelle couvre-objet et en la plaçant sur le porte-objet. Éviter d'appliquer une pression excessive et éviter le mouvement latéral de la lamelle couvre-objet.
14. Répéter les étapes 12 et 13 pour chaque porte-objet.
15. Rechercher une fluorescence spécifique à l'aide d'un microscope à fluorescence avec un grossissement de 200x ou plus.
    Les porte-objets peuvent être lus dès qu'ils sont préparés. Cependant, à cause de la présence d'un agent de décoloration dans le moyen de montage, aucune perte d'intensité dans la coloration n'a lieu si la lecture est retardée de 48 heures. Les porte-objets doivent être stockés dans le noir entre 2 et 8°C.

B. Détermination du Point final (titrage)
Un sérum positif lors du test de dépistage peut être testé de façon plus approfondie en suivant les étapes 5 à 13 pour déterminer le titre. Réaliser des dilutions progressives de raison 2 en commençant par la dilution de dépistage initiale. La valeur réciproque de la dilution la plus élevée fournissant une réaction positive est le titre. Les tableaux utilisés pour les dilutions standard sont fournis ci-dessous :

Préparation de Dilutions en Série Débutant à 1:4
Six tubes numérotés de 1 à 6. Ajouter 0.3 ml de Diluant d'Échantillon au tube 1 et 0.2 ml aux tubes 2 à 6. Ajouter avec une pipette 0.1 ml de sérum non dilué au tube 1 et mélanger correctement. Transférer 0.2 ml depuis le tube 1 vers le tube 2 et mélanger correctement. Continuer de transférer 0.2 ml d'un tube vers le suivant après avoir mélangé pour obtenir les dilutions mentionnées dans le tableau suivant :

Tubes	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Sérum	0.1 ml					
	+					
Diluant Tampon	0.3 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	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128 etc.

Préparation de Dilutions en Série Débutant à 1:10
Six tubes numérotés de 1 à 6. Ajouter 0.9 ml de Diluant d'Échantillon au tube 1 et 0.2 ml aux tubes 2 à 6. Ajouter avec une pipette 0.1 ml de sérum non dilué au tube 1 et mélanger correctement. Transférer 0.2 ml du tube 1 vers le tube 2 et mélanger correctement. Continuer de transférer 0.2 ml d'un tube vers le suivant après avoir mélangé pour obtenir les dilutions mentionnées dans le tableau suivant :

Tubes	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Sérum	0.1 ml					
	+					
Diluant Tampon	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.

CONTRÔLE QUALITÉ
Un Contrôle Positif ainsi qu'un Contrôle Négatif doivent être inclus avec chaque exécution du test. Le contrôle négatif ne doit pas afficher de fluorescence spécifique. Le laboratoire doit déterminer les caractéristiques de performance appropriées du Contrôle Positif utilisé.
Si des résultats inattendus sont obtenus, le test doit être réalisé de nouveau. Si des résultats inappropriés continuent de se produire avec les contrôles, cela peut être du à :

- Turbidité. Jeter la solution et utiliser un autre contrôle
- Problèmes liés au système optique du microscope à fluorescence. Il se peut que l'alignement ne soit pas correct, que la lampe ait dépassé sa date limite d'utilisation, etc.
- Laisser les porte-objets sécher pendant la procédure.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS
Les résultats du dosage d'immunofluorescence sont généralement reportés comme négatifs avec un titre inférieur à la dilution de dépistage, positifs avec un titre supérieur à la dilution de dépistage ou égal à la dilution de dépistage, ou bien, de préférence, positifs avec un titre ayant un point final spécifique. Les laboratoires doivent valider les protocoles utilisés pour ces matériaux et former les techniciens à la lecture des types de fluorescence correspondant au matériel utilisé et au test réalisé.

LIMITES DE LA PROCÉDURE
Les résultats de tous les tests d'immunofluorescence indirecte doivent être utilisés avec les résultats d'autres tests laboratoires en prenant compte de la condition clinique du patient lors de l'établissement d'un diagnostic.

Metodo generico di dosaggio per immunofluorescenza

FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

USO PREVISTO
I componenti elencati nella sezione "Materiali" possono essere utilizzati per il rilevamento degli anticorpi nel siero umano mediante immunofluorescenza indiretta.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE
Queste istruzioni per l'uso forniscono un protocollo generale per l'utilizzo di vetrini substrato e coniugati appropriati per gli studi di immunofluorescenza indiretta. Gli autoanticorpi possono essere visualizzati su una varietà di substrati di sezioni tissutali e colture cellulari utilizzando un sistema coniugato con FITC. La sezione seguente descrive il principio della procedura. I singoli laboratori possono utilizzare questo foglio illustrativo del prodotto come guida, ma devono eseguire la convalida dei protocolli interni usando questi materiali.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA
I componenti elencati nella sezione "Materiali" possono essere utilizzati nei protocolli di immunofluorescenza indiretta. In questo tipo di protocollo, i sieri dei pazienti vengono incubati su di un vetrino substrato per consentire il legame degli anticorpi. Tutti gli anticorpi non legati vengono eliminati per risciacquo. Gli anticorpi legati delle classi IgA, IgG e/o IgM, come stabilito in base al coniugato utilizzato, vengono rilevati mediante incubazione del substrato con coniugato anti-umano marcato con fluoresceina. Le reazioni sono osservate sotto un microscopio a fluorescenza dotato di filtri adeguati. La presenza degli anticorpi può essere dimostrata da una fluorescenza color verde mela di specifiche strutture istologiche nel substrato. Il titolo può essere determinato mediante diluizioni seriali del campione. Il titolo è il reciproco della maggior diluizione che produce una reazione positiva.[1]

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO
Conservazione e preparazione
Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. I reagenti sono pronti per l'uso dopo il raggiungimento dell'equilibrio a temperatura ambiente.

Materiali
Queste istruzioni sono fornite per l'utilizzo con i singoli componenti, compresi i codici di prodotto elencati di seguito. I vetrini substrato sono elencati a fianco del coniugato appropriato per il rilevamento degli autoanticorpi su quel particolare substrato.

Vetrino substrato		Coniugato		Controllo positivo		Diluizione dei campioni	Tempo di incubazione del campione*
[REF]	Descrizione	[REF]	Descrizione	[REF]	Descrizione		
2123-4	Vetrino con ghiandola surrenale di primate, 4 pozzetti	2099	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans, 5 ml (assorbiti su primate)	2279	Controllo positivo anticorpi anti-surrenali	1:4	30 minuti
2124	Vetrino con ghiandola salivare di primate, 6 pozzetti	2099	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans, 5 ml (assorbiti su primate)	2201	Controllo omogeneo ANA	1:10	30 minuti
2125-4	Vetrino con ovaio di primate, 4 pozzetti	2099	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans, 5 ml (assorbiti su primate)	2206	Controllo positivo anticorpi anti-cellule steroidee	1:10	3 ore
2128	Vetrino con cervelletto di primate, 6 pozzetti	2099	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans, 5 ml (assorbiti su primate)	2280	Controllo positivo anticorpi anti-Hu	1:10	30 minuti

2129-4	Vetrino con testicolo di primate, 4 pozzetti	2099	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans, 5 ml (assorbiti su primate)	2206	Controllo positivo anticorpi anti-cellule steroidee	1:10	3 ore
2134	Vetrino con nervo sciatico di primate, 6 pozzetti	2140	Anticorpi anti-IgM umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans, 5 ml	2209	Controllo positivo anticorpi anti-MAG	1:10	30 minuti
2147	Vetrino con sezioni di cute di primate, 6 pozzetti	2099	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans, 5 ml (assorbiti su primate)	2213 e/o 2217	Controllo positivo anticorpi intercellulari e/o controllo positivo anticorpi anti-BMZ	1:10	30 minuti
2155	Vetrino con esofago di primate, 4 pozzetti	2100 (o 2199)	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans, 5 ml (assorbiti su primate)	2213 e/o 2217	Controllo positivo anticorpi intercellulari e/o controllo positivo anticorpi anti-BMZ	1:10	30 minuti
2156	Vetrino con epitelio di transizione 6 pozzetti	2100	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans	2241	Controllo positivo anticorpi anti-PNP	1:10	30 minuti
2157	Vetrino con muscolo cardiaco di primate, 6 pozzetti	2099	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans, 5 ml (assorbiti su primate)	2235	Controllo positivo anticorpi anti-muscolo cardiaco/scheletrico	1:10	30 minuti
2158	Vetrino con muscolo scheletrico di primate, 6 pozzetti	2099	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans, 5 ml (assorbiti su primate)	2235	Controllo positivo anticorpi anti-muscolo cardiaco/scheletrico	1:10	30 minuti
2164	Vetrino con stomaco di primate, 6 pozzetti	2099	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans, 5 ml (assorbiti su primate)	2211	Controllo positivo anticorpi anti-ASMA	1:10	30 minuti
2180	Vetrino con tiroide di primate, 6 pozzetti	2099	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans, 5 ml (assorbiti su primate)	2239	Controllo positivo anticorpi anti-tiroidei/microsomali	1:10	30 minuti

* In tutti i casi, la seconda incubazione (incubazione del coniugato) è di 30 minuti.

Componenti opzionali

[REF]	Descrizione	U/M
2099	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, assorbiti su primate, colorazione di contrasto blu di Evans,	5 ml
2100	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans,	5 ml
2100x	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, senza colorazione di contrasto blu di Evans,	5 ml
2100-15	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans,	5 ml
2100-15x	Anticorpi anti-IgG umane di capra coniugati con FITC, senza colorazione di contrasto blu di Evans,	15 ml
2107	Anticorpi anti-IgA umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans,	5 ml
2107x	Anticorpi anti-IgA umane di capra coniugati con FITC, senza colorazione di contrasto blu di Evans,	5 ml
2107-15	Anticorpi anti-IgA umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans,	15 ml
2107-15x	Anticorpi anti-IgA umane di capra coniugati con FITC, senza colorazione di contrasto blu di Evans,	15 ml
2113	Anticorpi polivalenti (IgG/IgA) anti-umani di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans	5 ml
2113x	Anticorpi polivalenti (IgG/IgA) anti-umani di capra coniugati con FITC, senza colorazione di contrasto blu di Evans	5 ml
2113-15	Anticorpi polivalenti (IgG/IgA) anti-umani di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans	15 ml
2113-15x	Anticorpi polivalenti (IgG/IgA) anti-umani di capra coniugati con FITC, senza colorazione di contrasto blu di Evans	15 ml
2130	Anticorpi polivalenti (IgG/IgA/IgM) anti-umani di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans	5 ml
2130x	Anticorpi polivalenti (IgG/IgA/IgM) anti-umani di capra coniugati con FITC, senza colorazione di contrasto blu di Evans	5 ml
2130-15	Anticorpi polivalenti (IgG/IgA/IgM) anti-umani di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans	15 ml
2130-15x	Anticorpi polivalenti (IgG/IgA/IgM) anti-umani di capra coniugati con FITC, senza colorazione di contrasto blu di Evans	15 ml
2140	Anticorpi anti-IgM umane di capra coniugati con FITC, colorazione di contrasto blu di Evans,	5 ml
2140x	Anticorpi anti-IgM umane di capra coniugati con FITC, senza colorazione di contrasto blu di Evans,	5 ml
2200	Controllo Negativo IFA	0,5 ml
2201	Controllo positivo omogeneo ANA	0,5 ml
2206	Controllo positivo anticorpi anti-cellule steroidee	0,5 ml
2209	Controllo positivo anticorpi anti-MAG	0,5 ml
2211	Controllo positivo anticorpi anti-ASMA	0,5 ml
2209	Controllo positivo anticorpi anti-IC	0,5 ml
2213-1	Controllo titolo IC basso	0,5 ml
2214	Controllo positivo anticorpi anti-IC (*pemfigo volgare*)	0,5 ml
2216	Controllo positivo anticorpi anti-IC (*pemfigo foliaceo*)	0,5 ml
2217	Controllo positivo anticorpi anti-BMZ (pemfigoide)	0,5 ml
2235	Controllo positivo anticorpi anti-muscolo cardiaco/scheletrico	0,5 ml
2239	Controllo positivo anticorpi anti-tiroidei/microsomali	0,5 ml
2279	Controllo positivo anticorpi anti-surrenali	0,5 ml
2280	Controllo positivo anticorpi anti-Hu	0,5 ml
2301	PBS	per 1 litro
2302	Diluente per campioni	60 ml
2500	Vetrini coprioggetto per microscopio (24 x 60 mm)	confezione da 12
2505	Flaconcino contagocce per mezzo di montaggio	5 ml
2510	Colorazione di contrasto blu di Evans	1,0 ml

Simboli usati sulle etichette:

[LOT]	Codice del lotto
[REF]	Numero di catalogo
e	Utilizzare entro
t	Limiti di temperatura
!	Consultare le istruzioni per l'uso
[IVD]	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Fabbricante
s	Contenuto sufficiente per

Materiale richiesto ma non fornito
- Microscopio a fluorescenza
- Micropipetta o pipetta di Pasteur
- Pipette per sierologia
- Piastra di colorazione (ad es. vaso di Coplin)
- Provette piccole (ad es. 13 x 75 mm) e rastrelliera per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Contenitore da 1 litro
- Spruzzetta
- Carta assorbente
- Camera di incubazione

AVVERTENZE E PRECAUZIONI
Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana utilizzati sono stati testati per HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 e HTLV-I, risultando negativi ai test richiesti dalla FDA. Tutti i campioni di siero umano e i prodotti di derivazione umana vanno trattati come potenzialmente pericolosi, a prescindere dalla loro origine. Seguire le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la fornitura e lo smaltimento di questi materiali.[2]
ATTENZIONE: il sodio azide (NaN3) può reagire con le tubature in piombo e rame formando azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, risciacquare con grandi quantità d'acqua per evitare l'accumulo di azidi. Il sodio azide può essere tossico se ingerito. In caso di ingestione, informare immediatamente il direttore del laboratorio o il centro antiveleni.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI
Utilizzare solo campioni di siero per questa procedura. I campioni macroscopicamente emolizzati, lipemici o contaminati da batteri possono interferire con le prestazioni di questo test e non vanno utilizzati. Conservare i campioni a 2-8 °C per non più di una settimana. Per una conservazione prolungata, congelare il siero a -20 °C. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento dei campioni.

PROCEDURA
Metodo analitico
A. Screening
1. Diluire tutti i campioni di siero del paziente con il diluente tamponato secondo la diluizione raccomandata nella sezione Materiali forniti. 1:4 (0,1 ml di siero + 0,3 ml di diluente) oppure 1:10 (10 µl di siero + 90 µl di diluente). Non diluire i controlli positivi o quelli negativi da utilizzare. Mettere da parte i sieri non diluiti per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che le buste contenenti i vetrini substrato raggiungano l'equilibrio a temperatura ambiente per 10-15 minuti. Rimuovere con cura i vetrini senza toccare il substrato.
3. Etichettare i vetrini e metterli in una camera di incubazione foderata con carta assorbente inumidita con acqua per evitare l'essiccamento.
4. Capovolgere il flaconcino contagocce e premere delicatamente per applicare 1 goccia (circa 50 µl) di controllo negativo al pozzetto n. 1. Se appropriato, applicare 1 goccia del controllo positivo al pozzetto n. 2. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Con una micropipetta o una pipetta di Pasteur, applicare 1 goccia di siero diluito del paziente (circa 50 µl) agli altri pozzetti. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
6. Mettere il coperchio sulla camera di incubazione e incubare i vetrini a temperatura ambiente, secondo il tempo di incubazione campioni raccomandato nella sezione Materiali forniti.
7. Togliere un vetrino dalla camera di incubazione. Tenere il vetrino all'estremità della linguetta e sciacquarlo delicatamente con circa 10 ml di PBS utilizzando una pipetta o sciacquare il vetrino in un becher pieno di PBS.

Non utilizzare la spruzzetta. Trasferire immediatamente il vetrino nel vaso di Coplin e lavare per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti i vetrini restanti.

8. Rimuovere i vetrini dal vaso di Coplin. Asciugare il bordo del vetrino su carta assorbente per togliere il PBS in eccesso. Mettere il vetrino nella camera di incubazione. Capovolgere immediatamente il flaconcino contagocce con il coniugato e premere delicatamente per applicare 1 goccia (circa 50 µl) a ogni pozzetto.
9. Ripetere i passaggi **7 e 8** per ogni vetrino.
10. Rimettere il coperchio sulla camera di incubazione. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
11. Togliere un vetrino dalla camera di incubazione. Tenere il vetrino all'estremità della linguetta e immergerlo in un becher contenente PBS per rimuovere il coniugato in eccesso. Mettere i vetrini in una piastra di colorazione piena di PBS per 10 minuti. Se si utilizza il coniugato opzionale senza colorazione di contrasto (vedere i componenti opzionali nella sezione Materiali forniti), si possono aggiungere al lavaggio finale 2-3 gocce di colorazione di contrasto blu di Evans. Ripetere l'operazione per i vetrini restanti. NOTA: Il lavaggio scorretto può aumentare la fluorescenza di fondo.
12. Togliere un vetrino dalla piastra di colorazione. Asciugare il bordo del vetrino su carta assorbente per togliere il PBS in eccesso. **Per evitare che il vetrino si secchi, andare immediatamente al passo successivo mentre è ancora bagnato.**
13. Montare il vetrino coprioggetto applicandovi uniformemente **3 gocce** del mezzo di montaggio e mettere il vetrino coprioggetto sul vetrino. Evitare l'applicazione di una pressione eccessiva ed evitare il movimento laterale del vetrino coprioggetto.
14. Ripetere i passaggi 12 e 13 per ogni vetrino.
15. Cercare la fluorescenza specifica con un microscopio a fluorescenza e un ingrandimento di 200x o superiore. I vetrini sono pronti per la lettura non appena preparati. Tuttavia, data la presenza di un agente antiscolorimento nel mezzo di montaggio, non si verifica alcuna perdita significativa nell'intensità di colorazione se la lettura viene posticipata per un massimo di 48 ore. I vetrini vanno conservati al buio a 2-8 °C.

B. Determinazione dell'endpoint (titolazione)

Un siero positivo al test di screening può essere ulteriormente analizzato seguendo i punti da 5 a 13 per determinare il titolo. Preparare diluizioni duplici seriali a partire dalla diluizione di screening iniziale. Il titolo è il reciproco della maggior diluizione che produce una reazione positiva. Le seguenti tabelle indicano le diluizioni di screening standard:

Preparazione delle diluizioni seriali a partire da 1:4

Numerare sei provette da 1 a 6. Aggiungere 0,3 ml di diluente per campioni alla provetta 1 e 0,2 ml alle provette da 2 a 6. Pipettare 0,1 ml di siero non diluito nella provetta 1 e miscelare accuratamente. Trasferire 0,2 ml dalla provetta 1 alla provetta 2 e miscelare accuratamente. Continuare a trasferire 0,2 ml da una provetta a quella successiva dopo la miscelazione per produrre le diluizioni indicate nella seguente tabella:

Provette	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Siero	0,1 ml					
	+					
Diluente tamponato	0,3 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
	⇨	⇨	⇨	⇨	⇨	
Trasferire		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluizione finale	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128, ecc.

Preparazione delle diluizioni seriali a partire da 1:10

Numerare sei provette da 1 a 6. Aggiungere 0,9 ml di diluente per campioni alla provetta 1 e 0,2 ml alle provette da 2 a 6. Pipettare 0,1 ml di siero non diluito nella provetta 1 e miscelare accuratamente. Trasferire 0,2 ml dalla provetta 1 alla provetta 2 e miscelare accuratamente. Continuare a trasferire 0,2 ml da una provetta a quella successiva dopo la miscelazione per produrre le diluizioni indicate nella seguente tabella:

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
	⇨	⇨	⇨	⇨	⇨	
Trasferire		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, ecc.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Ogni esecuzione del test deve includere, sia un siero di controllo positivo, sia un siero di controllo negativo. Il controllo negativo non deve mostrare alcuna fluorescenza significativa. Il laboratorio deve determinare le caratteristiche prestazionali appropriate del controllo positivo utilizzato.

Se i risultati non corrispondono a quelli previsti, il test deve essere ripetuto. Se persistono risultati inadeguati con i controlli, ciò può essere dovuto a:

- Torbidità. Gettare il controllo e utilizzarne un altro.
- Problemi con il sistema ottico del microscopio a fluorescenza. Questi possono includere: allineamento scorretto, lampadina oltre la durata utile, ecc.

- Vetrino lasciato asciugare durante la procedura.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI
I risultati del dosaggio per immunofluorescenza sono generalmente refertati negativi con un titolo inferiore alla diluizione di screening, positivi con un titolo superiore o pari alla diluizione di screening o, preferibilmente, positivi con il titolo dello specifico endpoint. I laboratori devono convalidare i protocolli per l'impiego di questi materiali e i tecnici addestrati a leggere i pattern di fluorescenza specifici per i materiali in uso e i test eseguiti.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA
Quando si effettua una diagnosi, considerare i risultati di tutti i test di immunofluorescenza indiretta positivi, unitamente ai risultati di altri test di laboratorio e alle condizioni cliniche del paziente.

Método Geral do Ensaio de Imunofluorescência

FOLHETO DO PRODUTO

ÂMBITO DE UTILIZAÇÃO
Os componentes listados na secção “Materiais” podem ser utilizados para a detecção de anticorpos no soro humano por imunofluorescência indirecta.

RESUMO E EXPLICAÇÃO
Estas instruções de utilização fornecem um protocolo geral para o uso de lâminas de substrato e conjugados adequados para estudos de imunofluorescência indirecta. Os autoanticorpos podem ser visualizados numa série de secções de tecido e em substratos de culturas de células, utilizando um sistema conjugado FITC. O princípio do procedimento é descrito na secção seguinte. Os laboratórios podem utilizar individualmente este folheto do produto como um guia, mas devem realizar a validação interna dos seus protocolos para a utilização destes materiais.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO
Os componentes listados em “Materiais” podem ser utilizados em protocolos de imunofluorescência indirecta. Neste tipo de protocolo, o soro do paciente é incubado numa lâmina de substrato para permitir a ligação de anticorpos. Quaisquer anticorpos não ligados são removidos por lavagem. Os anticorpos ligados das classes IgA, IgG e/ou IgM, conforme determinado pelo conjugado utilizado, são detectados através da incubação do substrato com conjugado anti-humano marcado com fluoresceína. As reacções são observadas por um microscópio de fluorescência, equipado com filtros apropriados. A presença de anticorpos pode ser demonstrada por uma fluorescência verde-maçã de estruturas histológicas específicas no substrato. A titragem pode ser determinada através da diluição seriada da amostra. A recíproca da maior diluição que apresentar uma reacção positiva é a titragem.[1]

INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO
Armazenamento e preparação
Armazenar todos os reagentes a 2-8°C. Os reagentes estão prontos a utilizar após ficarem à temperatura ambiente.

Materiais
Estas instruções destinam-se a ser utilizadas com componentes individuais, incluindo os códigos de produtos listados em seguida. As lâminas do substrato são listadas ao lado do conjugado apropriado para a detecção de autoanticorpos no substrato específico.

Lâmina de Substrato		Conjugado		Controlo Positivo		Diluição da Amostra	Tempo de Incubação da Amostra*
[REF]	Descrição	[REF]	Descrição	[REF]	Descrição		
2123-4	Lâmina de Glândula Adrenal de Primata, 4 poços	2099	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans, 5ml (adsorvido de primata)	2279	Controlo Positivo Anticorpo Anti-Adrenal	1:4	30 minutos
2124	Lâmina de Glândula Salivar de Primata, 6 poços	2099	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans, 5ml (adsorvido de primata)	2201	Controlo Homogéneo ANA	1:10	30 minutos
2125-4	Lâmina de Ovário de Primata, 4 poços	2099	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans, 5ml (adsorvido de primata)	2206	Controlo Positivo Anticorpos Células Esteroidais	1:10	3 horas
2128	Lâmina de Cerebelo de Primata, 6 poços	2099	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans, 5ml (adsorvido de primata)	2280	Controlo Positivo Anticorpo Hu	1:10	30 minutos
2129-4	Lâmina de Testículo de Primata, 4 poços	2099	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans, 5ml (adsorvido de primata)	2206	Controlo Positivo Anticorpos Células Esteroidais	1:10	3 horas
2134	Lâmina de Nervo Ciático de Primata, 6 poços	2140	IgM de cabra anti-humano com Corante de Azul de Evans, 5ml	2209	Controlo Positivo Anticorpo MAG	1:10	30 minutos

2147	Lâmina de Split Skin de Primata, 6 poços	2099	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans, 5ml (adsorvido de primata)	2213 e/ou 2217	Controlo Positivo Anticorpos Intercelulares e/ou Controlo Positivo Anticorpos BMZ	1:10	30 minutos
2155	Lâmina de Esófago de Primata, 4 poços	2100 (ou 2199)	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans, 5ml (adsorvido de primata)	2213 e/ou 2217	Controlo Positivo Anticorpos Intercelulares e/ou Controlo Positivo Anticorpos BMZ	1:10	30 minutos
2156	Lâmina de epitélio de transição Primata, 4 poços	2100	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans	2241	Controlo Positivo PNP	1:10	30 minutos
2157	Lâmina de Músculo Cardíaco de Primata, 6 poços	2099	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans, 5ml (adsorvido de primata)	2235	Controlo Positivo Anticorpos Músculo Cardíaco/Esquelético	1:10	30 minutos
2158	Lâmina de Músculo Esquelético de Primata, 6 poços	2099	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans, 5ml (adsorvido de primata)	2235	Controlo Positivo Anticorpos Músculo Cardíaco/Esquelético	1:10	30 minutos
2164	Lâmina de Estômago de Primata, 6 poços	2099	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans, 5ml (adsorvido de primata)	2211	Controlo Positivo ASMA	1:10	30 minutos
2180	Lâmina de Tiróide de Primata, 6 poços	2099	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans, 5ml (adsorvido de primata)	2239	Controlo Positivo Anticorpo Microssomal/Tiróide	1:10	30 minutos

* A segunda incubação (incubação do conjugado) é, em todos os casos, de 30 minutos.

Componentes opcionais

[REF]	Descrição	U/M
2099	IgG de cabra anti-humano adsorvido de primata FITC com Corante Azul de Evans	5ml
2100	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans	5ml
2100x	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, sem Corante Azul de Evans	5ml
2100-15	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans	15ml
2100-15x	IgG anti-humana de cabra, marcada com FITC, sem Corante Azul de Evans	15ml
2107	IgA anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans	5ml
2107x	IgA anti-humana de cabra, marcada com FITC, sem Corante Azul de Evans	5ml
2107-15	IgA anti-humana de cabra, marcada com FITC, com Corante Azul de Evans	15ml
2107-15x	IgA anti-humana de cabra, marcada com FITC, sem Corante Azul de Evans	15ml
2113	FITC de cabra anti-humano polivalente (IgG/IgA) com Corante Azul de Evans	5ml
2113x	FITC de cabra anti-humano polivalente (IgG/IgA) sem Corante Azul de Evans	5ml
2113-15	FITC de cabra anti-humano polivalente (IgG/IgA) com Corante Azul de Evans	15ml
2113-15x	FITC de cabra anti-humano polivalente (IgG/IgA) sem Corante Azul de Evans	15ml
2130	FITC de cabra anti-humano polivalente (IgG/IgA/IgM) com Corante Azul de Evans	5ml
2130x	FITC de cabra anti-humano polivalente (IgG/IgA/IgM) sem Corante Azul de Evans	5ml
2130-15	FITC de cabra anti-humano polivalente (IgG/IgA/IgM) com Corante Azul de Evans	15ml
2130-15x	FITC de cabra anti-humano polivalente (IgG/IgA/IgM) sem Corante Azul de Evans	15ml
2140	IgM de cabra anti-humano FITC com Corante Azul de Evans	5ml
2140x	IgM de cabra anti-humano FITC sem Corante Azul de Evans	5ml
2200	Controlo Negativo IFA	0,5ml
2201	Controlo Positivo Homogéneo ANA	0,5ml
2206	Controlo Positivo Anti-Células Esteroidais	0,5ml

2209	Controlo Positivo Anti-MAG	0,5ml
2211	Controlo Positivo ASMA	0,5ml
2213	Controlo Positivo anti-IC	0,5ml
2213-1	Controlo de Titulação Baixa por CI	0,5ml
2214	Controlo Positivo anti-IC (*pemphigus vulgaris*)	0,5ml
2216	Controlo Positivo anti-IC (*pemphigus foliaceus*)	0,5ml
2217	Controlo Positivo anti-BMZ (penfigóide)	0,5ml
2235	Controlo Positivo anti-s Músculo Cardíaco/Esquelético	0,5ml
2239	Controlo Positivo anti-Microssomal/Tiróide	0,5ml
2279	Controlo Positivo Anti-Adrenal	0,5ml
2280	Controlo Positivo Anti-Hu	0,5ml
2301	PBS	para 1 litro
2302	Diluente da Amostra	60ml
2500	Cobertura de Vidro de Lâminas de Microscopia (24x60mm)	caixa de 12
2505	Ampola Conta-Gotas Meio de Montagem	5ml
2510	Corante Azul de Evans	1,0ml

Símbolos utilizados nas etiquetas:

[LOT] Número de lote

[REF] Número de catálogo

e Utilização por

t Temperatura de armazenamento

! Ler instruções de utilização

[IVD] Utilização diagnóstica in vitro

Fabricante

S Número de testes

Material necessário mas não fornecido

• Microscópio de fluorescência
• Micropipeta ou pipeta Pasteur
• Pipetas sorológicas
• Prato de coloração (por exemplo, frasco Coplin)
• Pequenos tubos de ensaio (por exemplo De 13 x 75 mm) e suporte para tubo de ensaio
• Água destilada ou desionizada
• Recipiente de 1 litro
• Garrafa de lavagem
• Toalhetes de papel
• Câmara de incubação

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Para Utilização Diagnóstica *in vitro.* Todos os componentes humanos utilizados foram testados para HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I, e considerados negativos pelos testes exigidos pela FDA. Todas as amostras de soro humano e produtos humanos derivados devem ser tratados como sendo potencialmente perigosos, independentemente da sua origem. Devem ser cumpridas as boas práticas laboratoriais de armazenamento, distribuição e eliminação destes materiais.[2]

ADVERTÊNCIA – A azida sódica (NaN3) pode reagir com o chumbo e o cobre das canalizações, formando azidas de metal altamente explosivas. Aquando da eliminção dos líquidos, lave com água abundante, a fim de prevenir a formação de azidas. A azida sódica pode ser tóxica se ingerida. No caso de ingestão, comunicar de imediato o incidente ao director do laboratório ou ao centro de controlo de venenos.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Só devem ser utilizadas amostras de soro para este procedimento. As amostras excessivamente hemolizadas, lipémicas ou contaminadas microbiologicamente podem interferir nos resultados deste teste, não devendo ser utilizadas. Armazenar as amostras a uma temperatura entre 2°a 8°C durante no máximo uma semana. Para um armazenamento de maior duração, as amostras de soro devem ser congeladas a -20°C. Evitar o repetido congelamento e derretimento das amostras.

PROCEDIMENTO

Método de teste

A. Rastreio

1. Diluir o soro de cada paciente com o Diluente Tamponado, de acordo com a diluição recomendada na secção Materiais Fornecidos. 1:4 (0,1 ml soro + 0,3 ml diluente) ou 1:10 (10 µl soro + 90 µl diluente). Não diluir os

Controlos Positivo ou Negativo a utilizar. Guardar o soro não diluído para determinar as titragens de anticorpos, caso os resultados dos testes de rastreio sejam positivos.

2. Deixar as bolsas que contêm as lâminas de substrato à temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Remover cuidadosamente as lâminas sem tocar no substrato.
3. Etiquetar as lâminas e colocá-las numa câmara de incubação forrada com toalhetes de papel humedecidos em água para evitar a secagem.
4. Inverter a ampola conta-gotas e apertar suavemente, aplicando 1 gota (aproximadamente 50 µl) do Controlo Negativo ao poço #1. Se for aplicável, aplicar 1 gota de Controlo Positivo no poço #2. Evitar encher demasiado os poços.
5. Utilizando uma micropipeta ou uma Pipeta de Pasteur, aplicar 1 gota de soro de paciente diluído (aproximadamente 50 µl) nos outros poços. Evitar encher demasiado os poços.
6. Colocar a tampa na câmara de incubação e incubar as laminas à temperatura ambiente, de acordo com o Tempo de Incubação da Amostra, recomendado na secção Materiais Fornecidos.
7. Remover uma lâmina da câmara de incubação. Segurar a extremidade da lâmina e lavar suavemente com cerca de 10 ml de PBS, utilizando uma pipeta, ou lavar a lâmina num recipiente contendo PBS. Não utilizar a garrafa de lavagem. Transferir de imediato a lâmina para o frasco Coplin e lavar durante 10 minutos. Repetir o processo com as lâminas remanescentes.
8. Remover a(s) lâmina(s) do frasco Coplin. Absorver a extremidade da lâmina num toalhete de papel para remover o PBS em excesso. Colocar a lâmina na câmara de incubação. Inverter imediatamente a ampola conta-gotas de Conjugado e apertar suavemente, aplicando uma gota (aproximadamente 50 µl) a cada poço.
9. Repetir os passos **7 e 8** para cada lâmina.
10. Substituir a tampa da câmara de incubação. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente.
11. Remover uma lâmina da incubadora. Segurar a extremidade da lâmina e mergulhar a lâmina num recipiente com PBS, para remover o conjugado em excesso. Colocar as lâminas num prato de coloração contendo PBS durante 10 minutos. Se for opcionalmente utilizado conjugado sem corante (consultar componentes opcionais na Secção Materiais Fornecidos), podem ser adicionadas 2-3 gotas de Corante Azul de Evans à lavagem final. Repetir para as lâminas remanescentes. NOTA: A lavagem inadequada pode conduzir a um aumento da fluorescência de fundo.
12. Remover uma lâmina do prato de coloração. Absorver a extremidade da lâmina num toalhete de papel para remover o PBS em excesso. **Para impedir que a lâmina seque, prosseguir de imediato para a etapa seguinte enquanto a lâmina ainda estiver húmida.**
13. Colocar a lamela aplicando de modo uniforme sobre a mesma **3 gotas** de Meio de Montagem, colocando-a sobre a lâmina. Evitar aplicar pressão indevida e impedir o movimento lateral da lamela.
14. Repetir os passos 12 e 13 para cada lâmina.
15. Examinar relativamente a fluorescência específica através de um microscópio de fluorescência com uma ampliação de 200x ou superior.
    As lâminas podem ser analisadas assim que forem preparadas. No entanto, devido à presença de um agente anti-descoloração no meio de montagem, não ocorre perda significativa da intensidade de coloração se a leitura for adiada até um máximo de 48 horas. As lâminas devem ser guardadas em local escuro a uma temperatura compreendida entre 2-8°C.

B. Determinação final (titulação)

Um soro positivo no teste de rastreio pode ser novamente testado, seguindo os passos de 5 a 13 para determinar a titragem. Realizar diluições seriadas em duplicado, começando na diluição de rastreio inicial. A recíproca da maior diluição que produzir uma reacção positiva é a titragem. São seguidamente fornecidas tabelas das diluições de rastreio padrão.

Preparação das diluições seriais com início em 1:4

Numerar seis tubos de 1 a 6. Adicionar 0,3 ml de Diluente de Amostra ao tubo 1 e 0,2 ml aos tubos 2 a 6. Pipetar 0,1 ml de soro não diluído no tubo 1 e misturar completamente. Transferir 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e misturar completamente. Continuar a transferir 0,2 ml de um tubo para o outro após a mistura, para produzir as diluições ilustradas na tabela seguinte:

Tubos	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Soro	0,1 ml					
	+					
Diluente Tamponado	0,3 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
	⇩	⇩	⇩	⇩	⇩	
Transferência		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Diluição final	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128 etc.

Preparação das diluições seriais com início em 1:10

Numerar seis tubos de 1 a 6. Adicionar 0,9 ml de Diluente de Amostra ao tubo 1 e 0,2 ml aos tubos 2 a 6. Pipetar 0,1 ml de soro não diluído no tubo 1 e misturar completamente. Transferir 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e misturar completamente. Continuar a transferir 0,2 ml de um tubo para o outro após a mistura, para produzir as diluições ilustradas 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
	⇩	⇩	⇩	⇩	⇩	
Transferência	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.

CONTROLO DE QUALIDADE

Devem ser incluídos em cada teste um Controlo Positivo e um Controlo Negativo. O Controlo Negativo não deve revelar fluorescência específica. O laboratório deve determinar as características de desempenho adequadas do Controlo Positivo utilizado.

Se não forem obtidos os resultados previstos, o teste deve ser repetido. Se continuarem a ocorrer resultados inadequados com os controlos, estes podem ser devidos a:

- Turvação. Eliminar e utilizar outro controlo.
- Problemas com o sistema óptico do microscópio de fluorescência. Estes podem incluir o alinhamento inadequado, lâmpada para além da expectativa de vida útil, etc.
- Permitir que a lâmina seque durante o procedimento.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados do teste de imunofluorescência são geralmente comunicados como negativos com uma titragem inferior à diluição de rastreio, positivos com uma titragem superior ou igual à diluição de rastreio ou, preferencialmente, positivos com uma titragem final específica. Os laboratórios devem validar protocolos para a utilização destes materiais e formar os técnicos, de modo a lerem os padrões de fluorescência específicos adequados aos materiais utilizados e ao teste efectuado.

LIMITAÇÃO DO PROCEDIMENTO

Os resultados de todos os testes positivos de imunofluorescência indirecta a par dos resultados de outros testes laboratoriais e da condição clínica do paciente durante o diagnóstico.

REFERENCES

1. 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.
2. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1993 [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395].

For technical assistance please contact:

IMMCO Diagnostics, Inc.
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120 USA
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

EC REP EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante Autorrizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé
EMERGO Euorpe.
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands
www.emergogroup.com

IMMCO Diagnostics, Inc.
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
www.immco.com

NOV2014