



AUTOANTIBODY TEST SYSTEM

IVD PRODUCT INSERT

REF 1102-60 60 Determinations

REF 1102 100 Determinations

REF 1102-120 120 Determinations

REF 1103 200 Determinations

REF 1103-240 240 Determinations

REF 1103-480 480 Determinations

REF 1103-512 512 Determinations

REF 1125 HEp-2/Mouse Kidney COMVI I 100 Determinations

REF 1134 HEp-2/Mouse Kidney/Stomach COMVI II 100 Determinations

INTENDED USE

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

SUMMARY AND EXPLANATION

Antinuclear antibodies (ANA), detected by indirect immunofluorescence aid in the diagnosis of connective tissue disorders including systemic lupus erythematosus SLE mixed connective tissue disease Sjögren's syndrome and scleroderma ^{1 5}. ANA occur in about 95% of SLE patients as well as patients with other connective tissue diseases. ANA may also occur in other disorders such as chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis ^{6 8}.

Anti-mitochondrial antibodies (AMA) occur in over 90% of primary biliary cirrhosis cases 3 11% of chronic active hepatitis patients and are absent in patients with extra hepatic biliary obstruction and in other liver diseases. The universal presence of anti mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis and their virtual absence in extra hepatic jaundice makes their detection of considerable value in the differential diagnosis ^{6 12}.

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

Anti-gastric parietal cell antibodies (AGPA) are commonly associated with pernicious anemia and chronic atrophic gastritis where they occur in about 90% and 50% of cases respectively. However they are not disease specific as they may occur in low frequency in other disorders. Although healthy individuals may have gastric parietal cell antibodies this finding may reflect asymptomatic atrophic gastritis. Negative findings for gastric parietal cell antibodies provide strong evidence for excluding pernicious anemia ^{15 17}.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

In the indirect F method used in this kit patients' sera are incubated on a variety of substrates HEp 2 cells or HEp 2 cells and mouse kidney/stomach sections to allow binding of antibodies. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the gG class are detected by incubation of the substrate with fluorescein labeled anti human gG conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of ANA ASMA AMA and AGPA is demonstrated by an apple green fluorescence of specific histologic structures in the tissue. The titers the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction are then determined by testing serial dilutions ¹⁸.

PRODUCT INFORMATION

Storage and preparation

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

EN

Materials provided

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

HEp-2/Mouse Kidney COMVI I **REF** 1125

HEp-2/Mouse Kidney-Stomach COMVI II **REF** 1134

20 x	SORB SLD 6	6 well Substrate Slides (1102-120)
6 x	SORB SLD 10	10 well Substrate Slides (1102-60)
10 x	SORB SLD 10	10 well Substrate Slides (1102, 1125, 1134)
20 x	SORB SLD 10	10 well Substrate Slides (1103)
20 x	SORB SLD 12	12 well Substrate Slides (1103-240)
40 x	SORB SLD 12	12 well Substrate Slides (1103-480)
32 x	SORB SLD 16	16 well Substrate Slides (1103-512)
1 x 0.5 ml	CONTROL + ANA *	ANA Positive Control. Contains human serum.
1 x 0.5 ml	CONTROL + AMA *	AMA Positive Control. Contains human serum. (1125, 1134)
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Negative Control. Contains human serum.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Anti-human gG F TC Conjugate with or without Evan's Blue. Protect from light. 1 vial (1102-60), 2 vials (1102, 1102-120, 1125, 1134), 3 vials (1103, 1103-240), 6 vials (1103-480, 1103-512)
1 x 60 ml	BUF *	Buffered Diluent. 1 vial (1102-60, 1102, 1102-120, 1125, 1134) 2 vials (1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
2 x	BUF WASH	Phosphate Buffered Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter. 2 vials (1102-60, 1102, 1102-120, 1125, 1134) 3 vials (1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Mounting Medium. Do not freeze. 1 vial (1102-60, 1102, 1125, 1134), 2 vials (1102-120, 1103), 3 vials (1103-240), 4 vials (1103-480, 1103-512)
1 x 12	COVER SLD	Coverslips. 1 box (1102-60, 1102), 2 boxes (1102-120, 1103), 3 boxes (1103-240, 1103-480)
1 x 12	COVER SLD LONG	Long Coverslips (1125, 1134), 3 boxes (1103-512)









Optional components

1 x 1.0 ml **EVANS** Evan's Blue Counterstain.

Contains < 0.1% NaN₃

EN

Symbols used on labels:

-  Lot number
-  Catalog number
-  Use by
-  Storage temperature
-  Read instructions for use
-  *n vitro* diagnostic use
-  Manufacturer
-  Number of Tests

Material required but not provided

- Fluorescence microscope
- Micropipette or Pasteur pipette
- Serological pipettes
- Staining dish (e.g. Coplin jar)
- Small test tubes (e.g. 13 x 75 mm) and test tube rack
- Distilled or deionized water
- 1 liter container
- 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, H V-1 and 2 and HTLV- and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regard-less of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹⁹.

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

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

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

PROCEDURE

Test Method

A. Screening

1. Dilute each patient serum 1:10 (with the Buffered Diluent provided 20 µl serum + 180 µl diluent) or 1:40 (10 µl serum + 390 µl diluent). Do not dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.

EN

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 μ l) of the Negative Control to well 1. Similarly apply 1 drop of ANA Positive Control to well 2. If applicable, 1 drop of AMA Positive Control to well 3 (1125, 1134). Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur Pipette, apply 1 drop of patient's diluted serum (approximately 50 μ l) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides 30 minutes at room temperature.
7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately 10 ml PBS using a pipette, or rinse slide in beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash 10 minutes. Repeat process with all remaining slides.
8. Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the Conjugate dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 μ l) to each well.
9. Repeat steps **7 and 8** for each slide.
10. Replace the lid on the incubation chamber. Incubate 30 minutes at room temperature.
11. Remove a slide from incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for 10 minutes. If optional conjugate without counterstain is used (see optional components in Materials Provided Section), 2-3 drops of Evan's Blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.
12. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **To prevent slide from drying, proceed immediately with next step while slide is still wet.**
13. Mount the coverslip by applying **3 drops** of Mounting Medium evenly on the coverslip and place coverslip over slide. Avoid applying undue pressure and prevent lateral movement of the coverslip.
14. Repeat steps 12 and 13 for each slide.
15. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater.

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

B. Endpoint Determination (titration)

A serum positive in the screening test may be further tested following steps 5 through 13 to determine the titer. Each test run should include the Positive and Negative Controls. Make serial two-fold dilutions starting at 1:10. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

Preparation of Serial Dilutions Starting at 1:10

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 of the nuclei, smooth muscle, tubules of the kidney or gastric parietal cells. The AMA Positive Control should have 2+ or greater staining intensity of the tubules of the kidney. The ANA Positive Control should have 2+ or greater staining intensity of the nuclei of the kidney with a predominantly homogeneous pattern.

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

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

INTERPRETATION OF RESULTS

The results of the tests for ANA, AMA, ASMA, and AGPA antibodies should be reported as negative (<10) on kidney stomach sections (1125, 1134) negative (<40) on HEp-2 cells (1102, 1102-60, 1102-120, 1130, 1103-240, 1103-480, 1103-512, 1125, 1134), positive (with titer greater than or equal to 320) or, alternatively, positive with specific endpoint titer.

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

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

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

Nuclear Membranous: The nuclear membrane stains most intensely as fine linear pattern with decreasing staining intensity of the nucleoplasm towards the center of the nucleus.

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

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

Centromere: Large speckles of finite number. Reactive antigen segregates with condensed chromosomes in cells undergoing mitosis.⁵

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

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

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

On HEp-2 cells, detectable cytoplasmic antibodies include anti-mitochondrial antibodies (AMA) and anti-smooth muscle antibodies (ASMA). In an AMA pattern, the cytoplasm appears granular, whereas the ASMA pattern is a

fibrillar network of staining throughout the cytoplasm. Both patterns should be reported as negative for ANA. AGPA only reacts on the parietal cells of the stomach and provides cytoplasmic reactions. Negative reactions on kidney with positive reactions on stomach are indicative of AGPA.

LIMITATION OF THE PROCEDURE

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

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

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

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

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

EXPECTED VALUES

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

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

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

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



ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

IVD ΕΝΘΕΤΟ ΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF	1102-60	60	ροσδιορισμοί
REF	1102	100	ροσδιορισμοί
REF	1102-120	120	ροσδιορισμοί
REF	1103	200	ροσδιορισμοί
REF	1103-240	240	ροσδιορισμοί
REF	1103-480	480	ροσδιορισμοί
REF	1103-512	512	ροσδιορισμοί
REF	1125	Her-2 COMVI I	νεφρό ποντικών 100 ροσδιορισμοί
REF	1134	Her-2 COMVI II	νεφρό ποντικών 100 ροσδιορισμοί

ΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

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

ΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ Ε ΕΞΗΓΗΣΗ

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

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

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

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

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

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

ΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΡΟΪΟΝΤΟΣ

Φύλαξη και προετοιμασία

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

EL

Υλικά που παρέχονται

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

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

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

20 x	SORB SLD 6	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος με 6 κυψελίδες (1102-120)
6 x	SORB SLD 10	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος με 10 κυψελίδες (1102-60)
10 x	SORB SLD 10	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος με 10 κυψελίδες (1102, 1125, 1134)
20 x	SORB SLD 10	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος με 10 κυψελίδες (1103)
20 x	SORB SLD 12	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος με 12 κυψελίδες (1103-240)
40 x	SORB SLD 12	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος με 12 κυψελίδες (1103-480)
32 x	SORB SLD 16	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος με 16 κυψελίδες (1103-512)
1 x 0,5 ml	CONTROL + ANA *	Διάλυμα θετικού ελέγχου για ANA. Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 0,5 ml	CONTROL + AMA *	Διάλυμα θετικού ελέγχου για AMA. Περιέχει ορό ανθρώπου. (REF 1125, 1134)
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Συζευκτικό αντίσωμα F TC κατά της ανθρώπινης gG Να προστατεύεται από το φως. 1 vial (1102-60), 2 vials (1102, 1102-120, 1125, 1134) 3 vials (1103, 1103-240), 6 vials (1103-480, 1103-512)
1 x 60 ml	BUF *	Αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα. 1 vial (1102-60, 1102, 1102-120, 1125, 1134), 2 vials (1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
2 x	BUF WASH	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Διαλύστε κάθε φιαλίδιο έως όγκο 1 λίτρου. 2 vials (1102-60, 1102, 1102-120, 1125, 1134), 3 vials (1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Μέσο επικάλυψης. Να μην καταψύχεται. 1 vial (1102-60, 1102, 1125, 1134), 2 vials (1102-120, 1103) 3 vials (1103-240), 4 vials (1103-480, 1103-512)
1 x 12	COVER SLD	Καλυπτρίδες. 1 box (1102-60, 1102), 2 boxes (1102-120, 1103) 3 boxes (1103-240, 1103-480)
1 x 12	COVER SLD LONG	Καλυπτρίδες μεγάλου μήκους (1125, 1134), 3 boxes (1103-512)

ροαιρετικά συστατικά

1 x 1,0 ml [EVANS](#) Επίχρωση Evans blue.

* Περιέχει < 0,1% NaN₃

EL

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

 Αριθμός παρτίδας

 Αριθμός καταλόγου

 Ημερομηνία λήξης

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης

 *in vitro* διαγνωστική χρήση

 Κατασκευαστής

 Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

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

ΡΟΕΙΔΟ ΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

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

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

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο. ην εναλλάσσετε τα συστατικά του kit με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics nc. ην το χρησιμοποιείτε μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

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

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μέθοδος ανάλυσης

A. Ανάλυση διαλογής

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

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

B. ροσδιορισμός τελικού σημείου (τιτλοδότηση)

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

ροετοιμασία των διαδοχικών αραιώσεων ξεκινώντας από την αναλογία 1:10

Αριθμήστε έξι σωληνάρια από το 1 έως το 6. Προσθέστε 0,9 ml διαλύματος αραιώσης δειγμάτων στο σωληνάριο 1 και 0,2 ml στα σωληνάρια 2 έως 6. Μεταφέρετε με πιπέτα 0,1 ml μη αραιωμένου ορού στο σωληνάριο 1 και αναμίξτε επιμελώς. Μεταφέρετε 0,2 ml από το σωληνάριο 1 στο σωληνάριο 2 και αναμίξτε επιμελώς. Συνεχίστε τη μεταφορά 0,2 ml από το ένα σωληνάριο στο επόμενο μετά από ανάμιξη, προκειμένου να επιτύχετε τις αραιώσεις που απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Σωληνάριο	1	2	3	4	5	6
Ορός	0,1 ml					
	+					
Αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↺	↺	↺	↺	↺
Μεταφορά	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Τελική αραιώση	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 κλπ.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΟΤΗΤΑΣ

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

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

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

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ Α ΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων για τα αντισώματα ANA, AMA, ASMA και AGPA θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικά (με τίτλο χαμηλότερο από 10), στα τμήματα στομαχιών νεφρών (1125, 1134) αρνητικά λι γότερο από 40 σε HEp-2 κύτταρα (1102, 1102-60, 1102-120, 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512, 1125, 1134) θετικά (με τίτλο υψηλότερο από ή ίσο με 320) ή εναλλακτικά θετικά με ειδικό τίτλο τελικού σημείου.

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

Τα αντισώματα ANA μπορούν να ανιχνευθούν σε όλα τα υποστρώματα, αλλά θα πρέπει να ποσοτικοποιούνται για

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

Ομοιογενές:	Όλος ο πυρήνας φθορίζει ομοιόμορφα με ένα διάχυτο πρότυπο χρώσης.
Πυρηνικός μεμβρανώδης:	Οι πυρηνικοί λεκέδες μεμβρανών ο πίο έντονα ως λεπτό γραμμικό σχέδιο με τη μειωμένος ένταση λεκιάσματος του πυρηνοπλάσματος προς το κέντρο του πυρήνα
Στικτό:	Διακριτικές αδρές ή λεπτές στρογγυλές κηλίδες φθορίζουν σε όλη την έκταση του πυρήνα.
πυρηνίσκου:	Οι πυρηνίσκοι χρωματίζονται ως πολλαπλά στερεά σωματίδια εντός του πυρήνα. Πεπερασμένος αριθμός μεγάλων κηλίδων.
Κεντρομεριδίου:	Το αντιδρών αντιγόνο διαχωρίζεται μαζί με τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα στα κύτταρα που βρίσκονται σε μίτωση ⁵

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

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

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

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

ΕΠΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

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

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

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

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

Ο κλινικός ιατρός θα πρέπει να εξετάσει τα αποτελέσματα όλων των θετικών αναλύσεων έμμεσου ανοσοφθορισμού,

σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα άλλων εργαστηριακών εξετάσεων και την κλινική κατάσταση του ασθενούς, προκειμένου να καταλήξει σε διάγνωση.

ANAMENOMENES TIMEΣ

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

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ Α ΟΔΟΣΗΣ

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

Σύγκριση κιτ που χρησιμοποιούν υπόστρωμα κυττάρων HE -2 για την ανίχνευση αντιπυρηνικών αντισωμάτων

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

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



DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS

IVD PROSPECTO

REF	1102-60	60 an lisis
REF	1102	100 analisis
REF	1102-120	120 an lisis
REF	1103	200 analisis
REF	1102-240	240 an lisis
REF	1103-480	480 analisis
REF	1103-512	512 analisis
REF	1125	riñón del ratón /HEp-2 COMVI I 100 analisis
REF	1134	riñón del ratón /HEp-2 COMVI II 100 analisis

USO PREVISTO

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

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La **óptica** **psa** **as (ANA)** **a** **fl** **s** **a** **a** **a** **diagnóstico de enfermedades del tejido conectivo, entre ellas el lupus eritematoso sistémico (LES)**, síndrome de Sjögren, esclerodermia y otras patologías del tejido conectivo¹⁻⁵. Alrededor del 95% de pacientes con LES es ANA positivo, así como pacientes con otras enfermedades del tejido conectivo. Pueden obtenerse resultados positivos para ANA en otras enfermedades tales como hepatitis activa crónica y cirrosis biliar primaria⁶⁻⁸.

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

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

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

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

En la técnica F indirecta utilizada en este kit, el suero del paciente se incuba en diferentes sustratos (células HEp-2 ó HEp-2 y secciones de estómago y riñón de ratón) para el ligado la unión de los anticuerpos. Los anticuerpos que no hayan reaccionado se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos ligados de clase gG se detectan incubando el sustrato con conjugado de gG antihumana marcada con fluoresceína. La reacción se observa con un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados. La presencia de ANA, ASMA, AMA y AGPA es denunciada es revelada por una fluorescencia de color verde manzana en estructuras histológicas específicas del tejido. Los títulos (el recíproco de la mayor dilución que provocó una reacción positiva) se determinan analizando las diluciones seriales seriadas.¹⁸

DATOS DEL PRODUCTO

Conservación y preparación

ES

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

Material suministrado

Células HEp-2 (REF) 1103-240, 1102-60, 1102, 1102-120, 1103, 1103-480, 1103-512

Células HEp-2 riñón de ratón COMVI I (REF) 1125

HEp-2/estómago y riñón de ratón COMVI II (REF) 1134

20 x	SORB SLD 6	Láminas Portas de sustrato con 6 pocillos (REF) 1102-120)
6 x	SORB SLD 10	Láminas Portas de sustrato con 10 pocillos (REF) 1102-60)
10 x	SORB SLD 10	Láminas Portas de sustrato con 10 pocillos (REF) 1102, 1125, 1134)
20 x	SORB SLD 10	Láminas Portas de sustrato con 10 pocillos (REF) 1103)
20 x	SORB SLD 12	Láminas Portas de sustrato con 12 pocillos (REF) 1103-240)
40 x	SORB SLD 12	Láminas Portas de sustrato con 12 pocillos (REF) 1103-480)
32 x	SORB SLD 16	Láminas Portas de sustrato con 16 pocillos (REF) 1103-512)
1 x 0.5 ml	CONTROL + ANA *	Control positivo para ANA. Contiene suero humano.
1 x 0.5 ml	CONTROL + AMA *	Control positivo para AMA. Contiene suero humano. (REF) 1125, 1134)
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Control negativo. Contiene suero humano.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Conjugado de gG antihumana F TC. Protéjase de la luz. 1 vial (1102-60), 2 vials (1102, 1102-120, 1125, 1134), 3 vials (1103, 1103-240), 6 vials (1103-480, 1103-512)
1 x 60 ml	BUF *	Diluyente tamponado. 1 vial (1102-60, 1102, 1102-120, 1125, 1134) 2 vials (1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
2 x	BUF WASH	Tampón fosfato salino (PBS). Disolver cada vial hasta 1 litro. 2 vials (1102-60, 1102, 1102-120, 1125, 1134) 3 vials (1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Medio de montaje. No congelar. 1 vial (1102-60, 1102, 1125, 1134), 2 vials (1102-120, 1103) 3 vials (1103-240), 4 vials (1103-480, 1103-512)
1 x 12	COVER SLD	Laminillas cubreobjetos. 1 box (1102-60, 1102), 2 boxes (1102-120, 1103), 3 boxes (1103-240, 1103-480)
1 x 12	COVER SLD LONG	Laminillas cubreobjetos. (1125, 1134), 3 boxes (1103-512)









Componentes opcionales

1 x 1.0 ml **EVANS** Contrastante azul de Evans

* Contiene < 0.1% NaN₃

ES

Símbolos empleados en las etiquetas:

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

Material necesario no incluido

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

ADVERTENCIAS

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

ATENCIÓN: la azida de sodio (NaN_3) puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías y formar azidas metálicas altamente explosivas. Después de dispensar líquidos, se recomienda lavar con abundante agua para prevenir la formación de dichas azidas. La azida de sodio puede ser tóxica por ingestión; en caso de ingestión accidental, informe inmediatamente del hecho al director del laboratorio o a un centro de control de envenenamientos.

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

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

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

PROCEDIMIENTO

Metodología del análisis

A. Control

1. Diluir el suero del paciente en proporción 1:10 (20 µl de suero + 180 µl de diluyente) o 1:40 (10 µl de suero + 390 µl de diluyente). No diluya los controles Positivo o Negativo. Conservar el suero no diluido para determinar la titulación de anticuerpos si los análisis resultaran positivos.
2. Espere a que las bolsas con las láminas los portas de substrato se estabilicen a la temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraiga las láminas los portas cuidadosamente sin tocar el substrato.
3. Etiquete las láminas los portas y colóquelas colóquelos en la cámara de incubación acondicionada con toallas de papel humedecidas para mantener las condiciones de humedad adecuadas.
4. Invierta el frasco gotero y aplique suavemente 1 gota (aproximadamente 50 µl) de Control negativo en el pocillo #1. Del mismo modo, aplicar 1 gota de ANA Control positivo en el pocillo #2. Si procede, 1 gota de AMA Control positivo en el pocillo #3 (1125, 1134). No llene demasiado los pocillos.
5. Con una micropipeta o pipeta Pasteur, coloque 1 gota de suero diluido del paciente (aproximadamente 50 µl) en los restantes pocillos. No llene demasiado los pocillos.
6. Coloque la tapa de la cámara de incubación; incube las láminas los portas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Retire una lámina un porta de la cámara de incubación. Sosteniéndola por un extremo, lávela lávelo delicadamente con una pipeta y aproximadamente 10 ml de PBS, o bien en una taza llena recipiente lleno de PBS. No utilice frasco de lavado. Transfiera de inmediato la lámina el porta a una cubeta de Coplin y lávela lávelo durante 10 minutos. Repita el procedimiento con las los restantes láminas portas.
8. Retire las láminas los portas de la cubeta de Coplin. Seque el borde de las láminas los portas con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Ponga las láminas los portas en la cámara de incubación. Acto seguido, con el frasco gotero de conjugado aplique 1 gota (aproximadamente 50 µl) en cada pocillo.
9. Repita los pasos **7 y 8** para cada lámina porta.
10. Coloque la tapa en la cámara de incubación. Incube 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Extraiga una lámina un porta de la incubadora del incubador. Sosteniéndola Sosteniéndolo por un extremo, sumérjala sumérjalo en un recipiente con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Ponga las láminas los portas en una cubeta de coloración llena de PBS durante 10 minutos. Si decide emplear conjugado sin contrastante contraste (véase Componentes opcionales en el apartado Materiales suministrados) puede añadir 2-3 gotas de contrastante contraste azul de Evans al lavado final. Repita el procedimiento en las láminas los portas restantes. NOTA: un lavado inadecuado podría producir fluorescencia de fondo.
12. Retire una lámina un porta de la cubeta de coloración. Seque el borde con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. **Para evitar que la lámina el porta se seque, pase de inmediato a la fase sucesiva mientras la lámina el porta todavía está húmeda.**
13. Monte la laminilla el cubre aplicando uniformemente en la misma **3 gotas** de medio de montaje; ponga la laminilla el cubre sobre la lámina el porta sin presionar demasiado y evitando que la laminilla se desplace lateralmente.
14. Repita los pasos 12 y 13 para cada lámina porta.
15. Examine la fluorescencia específica con microscopio de fluorescencia con aumento de 200x o más.

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

ES

B. Determinación de punto final (titulación)

Un suero que resulte positivo en la fase de control puede ser analizado nuevamente siguiendo los pasos de 5 a 13 para determinar el título. Cada ciclo de análisis incluirá los controles Positivo y Negativo. Prepare diluciones en serie y por duplicado a partir de 1:10. El recíproco de la mayor dilución que provoca una reacción positiva es la titulación.

Preparación de diluciones en serie a partir de 1:10

Numere seis tubos de 1 a 6. Ponga 0,9 ml de Diluyente de muestras en el número 1 y 0,2 ml en los tubos de 2 a 6. Pipetee 0,1 ml de suero sin diluir en el tubo 1 y mezcle bien. Transfiera 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezcle bien. Siga transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente después de mezclar hasta producir las diluciones indicadas en la siguiente tabla:

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

CONTROL DE CALIDAD

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

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

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

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de los análisis de anticuerpos ANA, AMA, ASMA y AGPA deben considerarse negativos (título inferior a 10), en la riñón estómago secciones (1125, 1134), negativos (título inferior a 40) sobre HEp-2 a células (1102, 1102-60, 1102-120, 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512, 1125, 1134) positivos (título equivalente o superior a 320) o, en alternativa, positivos con título de punto final específico.

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

Los ANA pueden detectarse en todos los sustratos, aunque debe cuantificarse en el riñón o las células HEp-2. Los patrones de tinción nuclear que se observan con el sustrato de riñón o con las células HEp-2 incluyen homogénea, periférica (margen), moteada y nucleolar. El patrón de tinción de los centrómeros (incluyendo las figuras mitóticas) se presenta más fácilmente en las células HEp-2. Estos patrones de tinción nuclear se describen más abajo. Puede ser uno solo o bien una combinación de varios patrones de tinción causada por reacciones ante muchos antígenos nucleares diferentes.

ES

Homo énea:	Todo el núcleo adquiere fluorescencia homocénea con patrón de tinción difusa.
Membranoso Nuclear:	La membrana nuclear mancha lo más intenso posible como patrón muy bien lineal con la intensidad de coloración de disminución del nucleoplasma hacia el centro del núcleo
Moteada:	Manchas discretas, de pequeñas a grandes, adquieren fluorescencia en todo el núcleo.
Nucleolar:	Tinción de los nucleolos con motas grandes y gruesas en el núcleo.
Centrímeros:	Motas grandes en cantidad limitada. Los antígenos reactivos se separan con cromosomas condensados en células sometidas a mitosis ⁵

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

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

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

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

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

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

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

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

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

VALORES ESPERADOS

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

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

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

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

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

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



TESTSYSTEM FÜR AUTOANTIKÖRPER

IVD BEIPACKTEXT

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

VERWENDUNGSZWECK

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

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

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

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

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

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

TESTPRINZIP

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

PRODUKTINFORMATION Lagerung und Zubereitung

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

DE

Mittelieferte Materialien

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

HEp-2-Mausniere/COMVI I **REF** 1125

HEp-2/Mausniere/-magen/COMVI II **REF** 1134

20 x	SORB SLD 6	Substrat-Objekträger mit 6 Vertiefungen (1102-120)
6 x	SORB SLD 10	Substrat-Objekträger mit 10 Vertiefungen (1102-60)
10 x	SORB SLD 10	Substrat-Objekträger mit 10 Vertiefungen (1102, 1125, 1134)
20 x	SORB SLD 10	Substrat-Objekträger mit 10 Vertiefungen (1103)
20 x	SORB SLD 12	Substrat-Objekträger mit 12 Vertiefungen (1103-240)
40 x	SORB SLD 12	Substrat-Objekträger mit 12 Vertiefungen (1103-480)
32 x	SORB SLD 16	Substrat-Objekträger mit 16 Vertiefungen (1103-512)
1 x 0,5 ml	CONTROL + ANA *	ANA-positives Kontrollserum. Enthält Humanserum.
1 x 0,5 ml	CONTROL + AMA *	AMA-positives Kontrollserum. Enthält Humanserum. (1125, 1134)
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Negatives Kontrollserum. Enthält Humanserum.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Anti-human- gG-F TC-Konjugat. Vor Licht schützen. 1 vial (1102-60), 2 vials (1102, 1102-120, 1125, 1134), 3 vials (1103, 1103-240), 6 vials (1103-480, 1103-512)
1 x 60 ml	BUF *	Gepuffertes Verdünnungsmittel. 1 vial (1102-60, 1102, 1102-120, 1125, 1134) 2 vials (1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
2 x	BUF WASH	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS). Jedes Fläschchen auf 1 Liter auffüllen. 2 vials (1102-60, 1102, 1102-120, 1125, 1134) 3 vials (1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Eindeckmittel. Nicht einfrieren. 1 vial (1102-60, 1102, 1125, 1134), 2 vials (1102-120, 1103), 3 vials (1103-240), 4 vials (1103-480, 1103-512)
1 x 12	COVER SLD	Deckgläschen. 1 box (1102-60, 1102), 2 boxes (1102-120, 1103), 3 boxes (1103-240, 1103-480)
1 x 12	COVER SLD LONG	Langes Deckgläschen (1125, 1134), 3 boxes (1103-512)

Optionale Bestandteile

1 x 1,0 ml **EVANS** Evans-Blau-Gegenfärbung.

* Enthält < 0,1% NaN₃


DE

Auf den Etiketten verwendete Symbole:


 Chargennummer

 Bestellnummer


 Verwendbar bis

 Lagerungstemperatur

 Gebrauchsanleitung lesen

 n-vitro-Diagnostikum

 Hersteller

 Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

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

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

n-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, H V-1 und -2 und HTLV- getestet und für negativ befunden. Alle menschlichen Serumproben und Produkte menschlichen Ursprungs sollten unabhängig von ihrer Herkunft als potentiell gefährlich behandelt werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹⁹.

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

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

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

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

DE

VERFAHREN

Testmethode

A. Suchtest

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

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

B. Endpunkt-Bestimmung (Titration)

Sie können ein im Suchtest positives Serum weiter testen, indem Sie Schritte 5 bis 13 befolgen, um den Titer zu bestimmen. Bei jedem Testlauf sollten die positiven und negativen Kontrollseren mitverwendet werden. Stellen Sie beginnend mit 1:10. Der Kehrwert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion hervorruft, entspricht dem Titer.

Vorbereitung der Verdünnungsreihen, mit 1:10 beginnend

Nummerieren Sie sechs Röhrrchen von 1 bis 6. Geben Sie 0,9 ml Probenverdünner in Röhrrchen 1 und je 0,2 ml in Röhrrchen 2 bis 6. Pipettieren Sie 0,1 ml unverdünntes Serum in Röhrrchen 1 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie 0,2 ml von Röhrrchen 1 in Röhrrchen 2 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie nach dem Mischen weiterhin jeweils 0,2 ml von einem Röhrrchen ins nächste, um die in der nachfolgenden Tabelle angezeigten Verdünnungen zu erhalten:

Röhrrchen	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		⇄	⇄	⇄	⇄	⇄
Endverdünnung	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 usw.

QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

AUSLEGUNG DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Tests für ANA, AMA, ASMA und AGPA sollten als negativ (bei einem Titer unter 10), Auf Nierenmagenabschnitten (1134, 1125), negativ (<40) on HEP-2-Zellen (1102, 1102-60, 1102-120, 1103, 1103-240, 1103-512, 1125, 1134) positiv (bei einem Titer von oder über 320) oder alternativ als positiv mit spezifischem Endpunkt-Titer angegeben werden.

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

ANA können auf allen Substraten nachgewiesen werden, sollten jedoch auf den Nieren oder HEP-2-Zellen quantifiziert werden. Zu den mit dem gelieferten Nierensubstrat oder den HEP-2-Zellen zu beobachtenden nukleären Färbemustern zählen homogene, periphere (am Rand liegende), gefleckte und nukleoläre Muster. Das Centromerfärbemuster (einschließlich mitotischer Figuren) ist auf HEP-2-Zellen am leichtesten zu sehen. Diese

nukleären Färbemuster sind unten beschrieben. Sie können aus einem oder einer Verbindung mehrerer Färbemuster bestehen. Letztere sind auf Reaktionen gegen mehrere verschiedene nukleäre Antigene zurückzuführen.

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

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

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

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

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

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

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

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

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

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

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

ERWARTETE WERTE

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

LEISTUNGSMERKMALE

Das ImmuGlo™ Testsystem für Autoantikörper wurde mit einem anderen im Handel erhältlichen Fluoreszenzantikörpertest mit HEp-2-Zellen als Substrat verglichen. Der Vergleich schloss 15 Serumproben

DE

von normalen Testpersonen sowie Seren von Patienten mit SLE, subakutem kutanem Lupus erythematoses, Sklerodermie oder rheumatoider Arthritis ein. Die Seren wurden entsprechend den vom Hersteller empfohlenen Verfahren und Suchtestverdünnungen untersucht. Sie erbrachten vergleichbare Ergebnisse, die nachfolgend zusammengefasst sind:

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

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

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



DETECTION DES AUTOANTICORPS

IVD ENCART DU PRODUIT

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

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

GENERALITES

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

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

Les **Anticorps anti-muscle lisse (ASMA)** se retrouvent en titre élevé (> 160) dans la majorité de cas d'hépatite active chronique et en titre intermédiaire (40-80) dans l'hépatite virale aiguë. De temps en temps ils peuvent se retrouver dans les cas de PBC où ils sont également trouvés dans des titres intermédiaires. La signification des titres de 20-40 est douteuse puisque ces valeurs peuvent se retrouver chez les individus normaux^{13,14}.

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

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Dans la méthode à F indirecte utilisée dans ce kit, les sérums des patients sont incubés sur une diversité de substrats (cellules HEp-2 ou cellules HEp-2 et parties de rein/estomac de souris) pour permettre la liaison des anticorps. Un rinçage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué anti-gG humaines, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps de classe gG fixés. Les réactions sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert pomme des structures histologiques spécifiques du tissu montre la présence d'ANA, ASMA, AMA et AGPA. Les titres du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) sont alors déterminés par dilutions successives.¹⁸

INFORMATION PRODUIT

Conservation et préparation des réactifs

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

FR

Mat riel fourni

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

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

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









20 x	SORB SLD 6	Lames 6 puits (REF 1102-120)
6 x	SORB SLD 10	Lames 10 puits (REF 1102-60)
10 x	SORB SLD 10	Lames 10 puits (REF 1102, 1125, 1134)
20 x	SORB SLD 10	Lames 10 puits (REF 1103)
20 x	SORB SLD 12	Lames 12 puits (REF 1103-240)
40 x	SORB SLD 12	Lames 12 puits (REF 1103-480)
32 x	SORB SLD 16	Lames 16 puits (REF 1103-512)
1 x 0,5 ml	CONTROL + ANA *	Contrôle positif ANA, avec sérum humain.
1 x 0,5 ml	CONTROL + AMA *	Contrôle positif AMA, avec sérum humain. (REF 1125, 1134)
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Contrôle négatif, avec sérum humain.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Conjugué F TC anti- gG humaines. Maintenir à l'abri de la lumière. 1 vial (1102-60), 2 vials (1102, 1102-120, 1125, 1134), 3 vials (1103, 1103-240), 6 vials (1103-480, 1103-512)
1 x 60 ml	BUF *	Diluant sérum. 1 vial (1102-60, 1102, 1102-120, 1125, 1134) 2 vials (1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
2 x	BUF WASH	Tampon phosphate salin (PBS). Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre. 2 vials (1102-60, 1102, 1102-120, 1125, 1134), 3 vials (1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Milieu de montage. Ne pas congeler 1 vial (1102-60, 1102, 1125, 1134), 2 vials (1102-120, 1103), 3 vials (1103-240), 4 vials (1103-480, 1103-512)
1 x 12	COVER SLD	Lamelles couvre-lames. 1 box (1102-60, 1102), 2 boxes (1102-120, 1103), 3 boxes (1103-240, 1103-480)
1 x 12	COVER SLD LONG	Longue lamelle couvre-lame (1125, 1134), 3 boxes (1103-512)

Composants en option

1 x 1,0 ml [EVANS](#) Contre-coloration bleu d'Evans.

* Contient < 0.1% NaN₃

Symboles utilisés sur les étiquettes:

-  Numéro de lot
-  Numéro de référence catalogue
-  A utiliser avant
-  Température de conservation
-  Lire les instructions d'utilisation
-  Pour usage diagnostique *in vitro*
-  Fabricant
-  Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

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

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-V H1, anti-V H2 et HTLV-). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage¹⁹.

ATTENT ON - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN_3). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

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

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

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

MODE OPÉRATOIRE**A. Dépistage**

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:10 (20µl de sérum + 180µl de diluant) or 1:40 (10µl de sérum + 390µl de diluant). Ne pas diluer les contrôles positifs ou négatifs. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des anticorps dans le cas où le dépistage serait positif.

FR

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

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

B. Détermination du titre par les dilutions en cascade

Un sérum trouvé positif au test de dépistage doit être retesté en suivant les étapes 5 à 13 afin de définir son titre. Inclure dans chaque nouvelle série un contrôle positif et négatif. Les dilutions en série de 2 en 2 sont réalisées à partir du 1:10. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

Préparation de Dilutions en Série commençant 1:10

Numérotter six tubes de 1 à 6. Ajouter 0,9 ml de diluant échelonné dans le tube 1 et 0.2 ml dans les tubes 2 à 6. Pipeter 0.1ml de sérum pur dans le tube 1 et giter soigneusement. Transférer 0.2 ml du tube 1 dans le tube suivant. Continuer à transférer 0.2 ml d'un tube à l'autre en mélangeant bien chaque tube pour arriver aux dilutions suivantes :

Tubes	1	2	3	4	5	6
Sérum	0,1 ml					
	+					
Diluant Echantillon	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 nale	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

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

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

- La turbidité. Éliminer le contrôle et en utiliser un nouveau.
- Au système optique du microscope. Par exemple: mauvais alignement, l'ampoule n'a pas été changée depuis longtemps, etc.
- À un dessèchement des lames pendant l'imposition.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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

Ne considérer que les champs comprennent une coloration spécifique des noyaux du rein et des cellules HEp-2 et la confirmation observée pour les ANA, les tubules de rein pour les AMA, les piliers des villosités sinueuses du rein pour les ASMA et les cellules périépigastriques uniquement pour les AGPA. Toute autre réaction doit être considérée comme négative pour les ANA, les AMA, les ASMA et/ou les AGPA.

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

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

La spécificité de certains des anticorps donne les confirmations de coloration ci-dessus peut être précisée par des essais pour des anticorps anti-DNA et pour divers antigènes nucléaires extracellulaires. Ceux-ci peuvent être d'importance diagnostique comme énuméré dans le tableau 1 à la fin de ce document.

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

FR

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

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

LIMITES D'UTILISATION

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

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

L'apât conjugué anti-gG F TC humaines fourni dans ce kit est principalement spécifique pour les chaînes lourdes mais une légère réactivité chaîne légère. Il réagit principalement avec les anticorps de la classe des gG mais peut à un degré moindre réagir avec des chaînes légères d'autres classes d'anticorps tels les gM.

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

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

VALEURS PRÉVUES

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

PERFORMANCES

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

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

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

FR

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



TEST DI RILEVAZIONE DI AUTOANTICORPI IN IMMUNOFLUORESCENZA

IVD INSERTO DEL PRODOTTO

REF	1102-60	60 Determinazioni
REF	1102	100 Determinazioni
REF	1102-120	120 Determinazioni
REF	1103	200 Determinazioni
REF	1103-240	240 Determinazioni
REF	1103-480	480 Determinazioni
REF	1103-512	512 Determinazioni
REF	1125	Rene del mouse HEp-2 COMVI I 100 Determinazioni
REF	1134	Rene/Stomaco del mouse HEp-2 COMVI II 100 Determinazioni

FINALITÀ DI USO

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

SOMMARIO E SPIEGAZIONE del test

Gli **anticorpi antinucleari (ANA)** individuati con il tecnico di immunofluorescenza indiretta sono utili nella diagnosi dei disturbi del tessuto connettivo quali il lupus eritematoso sistemico (LES) e le malattie miste del tessuto connettivo (sindrome di Sjögren e la sclerodermia)¹⁵. Gli ANA compaiono in circa il 95% dei pazienti affetti da LES e in pazienti con altri disturbi del tessuto connettivo. Gli ANA possono essere riscontrati anche in caso di altre patologie quali l'epatite cronica e le cirrosi biliari primitive^{6,8}.

Gli **anticorpi antimitocondriali (AMA)**, sono presenti in circa il 90% dei casi di cirrosi biliari primitive nel 3-11% dei pazienti con epatite cronica e mentre sono assenti in pazienti con lesioni biliari extraepatiche o fette di altre epatopatie. La presenza universale di anticorpi antimitocondriali in caso di cirrosi biliari primitive e la virtuale assenza nell'epatite extraepatica rendono l'identificazione di considerevole valore per la diagnosi differenziale^{6,12}.

Gli **anticorpi antimuscolo liscio (ASMA)** in titoli elevati (>160 compaiono nella maggior parte dei casi di epatite cronica e in titoli intermedi (40-80 nei casi di epatite virale cut). Occasionalmente possono essere presenti con epatite biliari primitive anche in titoli intermedi. La significatività dei titoli di 20-40 è incerta dato che questi valori possono essere riscontrati in individui normali^{13,14}.

Gli **anticorpi anticellule parietali gastriche (AGPA)** sono comunemente associati con i nemici perniciosi e le gastrite croniche con ricorrenza rispettivamente in circa il 90% e 50% dei casi. Gli AGPA non sono specifici e possono ricorrere con frequenza inferiore in altre patologie. Malgrado gli individui sani possono presentare anticorpi anticellule parietali gastriche la loro individuazione può riflettere la presenza di gastrite trofica sintomatica. Esiti negativi della presenza di anticorpi anticellule parietali gastriche forniscono un'evidenza consistente per l'esclusione dell' nemico pernicioso^{15,17}.

PRINCIPI DELLA METODICA

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

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

Conservazione e preparazione

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

T

Materiali forniti

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

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

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

20 x	SORB SLD 6	Vetrini da 6 pozzetti (REF 1102-120)
6 x	SORB SLD 10	Vetrini da 10 pozzetti (REF 1102-60)
10 x	SORB SLD 10	Vetrini da 10 pozzetti (REF 1102, 1125, 1134)
20 x	SORB SLD 10	Vetrini da 10 pozzetti (REF 1103)
20 x	SORB SLD 12	Vetrini da 12 pozzetti (REF 1103-240)
40 x	SORB SLD 12	Vetrini da 12 pozzetti (REF 1103-480)
32 x	SORB SLD 16	Vetrini da 16 pozzetti (REF 1103-512)
1 x 0.5 ml	CONTROL + ANA *	Controllo Positivo ANA. Contiene siero umano no.
1 x 0.5 ml	CONTROL + AMA *	Controllo Positivo AMA. Contiene siero umano no. (REF 1125, 1134)
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Controllo Negativo. Contiene siero umano no.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Coniugato FITC anti-IgG. Proteggere dalla luce. 1 vial (1102-60), 2 vials (1102, 1102-120, 1125, 1134), 3 vials (1103, 1103-240), 6 vials (1103-480, 1103-512)
1 x 60 ml	BUF *	Diluente tampone. 1 vial (1102-60, 1102, 1102-120, 1125, 1134) 2 vials (1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
2 x	BUF WASH	Soluzione salina tampone con fosfato (PBS). Da ricostituire 1 litro. 2 vials (1102-60, 1102, 1102-120, 1125, 1134), 3 vials (1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Liquido di montaggio. Non congelare. 1 vial (1102-60, 1102, 1125, 1134), 2 vials (1102-120, 1103), 3 vials (1103-240), 4 vials (1103-480, 1103-512)
1 x 12	COVER SLD	Vetrini coprioggetto. 1 box (1102-60, 1102), 2 boxes (1102-120, 1103), 3 boxes (1103-240, 1103-480)
1 x 12	COVER SLD LONG	Vetrini coprioggetto lunghi. (1125, 1134), 3 boxes (1103-512)


Componenti opzionali

1 x 1.0 ml [EVANS](#) Colorante di contrasto Blu di Evans.

Contiene < 0,1% N₂


T


Simboli usati sulle etichette:


 Numero di lotto

 Numero di catalogo


 Scadenza

 Temperatura di conservazione

 Leggere le istruzioni per l'uso

 Uso diagnostico in vitro

 Produttore

 Numero di test

Materiali necessari non forniti

- Microscopio a fluorescenza
- Micropipetta o pipetta Pasteur
- Pipette sierologiche
- Vials per colorazione (ad es. vials Coplin)
- Provette piccole per test (ad es. 13 x 75 mm) e rack per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Contenitore da 1 litro.
- Filtri conica di lavaggio
- Soluzioni di controllo
- Camere umide per l'incubazione

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

AVVERTENZA – L'azide sodica (N_3^-) può reagire con gli acidi idrurici in piombo e mercurio per formare azidi metallici altamente esplosivi. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveneni.

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

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questo procedimento usare unicamente campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a $2-8^\circ\text{C}$ per non oltre un settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati a -20°C . Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

T

PROCEDURA

Metodo del test

A. Screening

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

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

T

B. Determinazione Endpoint (titolazione)

Un siero positivo I test di screening può essere analizzato ulteriormente ripetendo le fasi da 5 a 13 per determinare il titolo anticorpale. Ogni serie di test deve includere Controlli Positivi e Negativi. Preparare diluizioni seriali doppie a partire da 1:10. Il reciproco del valore della più alta diluizione eseguita cui il campione mostra positività è il valore del titolo.

Preparazione delle Diluizioni Seriali a partire da 1:10

Numero 6 provette da 16. Aggiungere 0,9 ml di Diluente del Campione nella provetta 1 e 0,2 ml nelle provette da 2 a 6. Pipettare 0,1 ml di siero non diluito nella provetta 1 e mescolare accuratamente. Trasferire 0,2 ml dalla provetta 1 alla provetta 2 e mescolare accuratamente. Continuare a trasferire 0,2 ml da una provetta alla successiva, dopo la miscelazione, per ottenere le diluizioni indicate nella tabella seguente:

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

CONTROLLO DI QUALITÀ

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

Se non si ottengono i risultati attesi, il procedimento dovrebbe essere ripetuto. Se i controlli continuano a produrre risultati discordanti, ciò può essere dovuto a:

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

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dei test per gli anticorpi ANA, AMA, ASMA e AGPA dovrebbero essere riportati come negativi con titolo inferiore <10, sulle sezioni della stomaco del rene (1125, 1134) negativo (<40) sulle cellule HEp-2 (1102, 1102-60, 1102-120, 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512, 1125, 1134), positivi con titolo superiore o uguale a 320 o, in alternativa, positivi con titolo endpoint specifico.

Leggere unicamente, per gli ANA i campioni con ennesima colorazione specifica dei nuclei renali e delle cellule epiteliali HEp 2 e il pattern osservato, per gli AMA i tubuli renali, per gli ASMA le pareti dei vasi sanguigni renali e per gli AGPA le cellule periferiche. I risultati per ANA, AMA, ASMA e/o AGPA dovrebbero essere riportati come negativi.

Gli ANA possono essere rilevati su tutti i substrati dovrebbero essere qualificati sul rene o sulle cellule epiteliali HEp 2. Il pattern di colorazione nucleare osservabile con il substrato renale o con le cellule epiteliali HEp 2 può essere di tipo omogeneo, periferico (bordo), puntiforme e nucleolare. Il pattern di colorazione del centro (includendo le figure mitotiche) è più evidente sulle cellule epiteliali HEp 2. I pattern di colorazione nucleare possibili sono descritti di seguito e possono manifestarsi in uno o più combinazioni come risultato di reazioni diverse in geni nucleari.

T

Omogeneo:	Fluorescenza uniforme dell'intero nucleo con pattern di colorazione diffuso.
Membranous nucleare:	La membrana nucleare macchia il più intensamente e come modello benissimo lineare con l'intensità di macchiatura diminuisce e del nucleoplasma verso il centro del nucleo
Punteggiato:	Fluorescenza macchie ondeggianti di granuli finemente granuli nell'intero nucleo.
Nucleolare:	nucleoli si colorano come corpi solidi multipli all'interno del nucleo.
Centromero:	Macchie larghe di numero finito. L'intensità relativa è segregata con i cromosomi condensati in cellule in fase mitotica ⁵ .

Le specificità di alcuni degli anticorpi che producono i pattern di colorazione citici possono essere ulteriormente identificate mediante test per gli anticorpi anti-DNA e per vari antigeni nucleari esseribili, con i significativi ai diagnostici indicati nella tabella 1 riportata. Il fine di questo documento.

Gli AMA possono essere rilevati sui tubuli distali che su quelli prossimi del rene con un colorazione che risulta maggiormente brillante sui tubuli distali. Maggiore si è un colorazione del citoplasma delle cellule pruriginose ricche, gli AMA dovrebbero essere quantitativi sul rene.

Con gli ASMA si può osservare un colorazione del muscolo liscio e dello stomaco e dei glomeruli renali, ma solo gli ASMA visibili sulle pareti dei vasi sanguigni dovrebbero essere riportati.

Sulle cellule epiteliali HEp-2, gli anticorpi citoplasmatici rilevabili includono gli anticorpi mitocondriali (AMA) e quelli nel muscolo liscio (ASMA). Nel pattern AMA il citoplasma è di tipo granulare, mentre il pattern per gli ASMA risulta come un reticolo fibrillare che colora l'intero citoplasma. Entrambi i pattern dovrebbero essere riportati come negativi per gli ANA. Gli AGPA reagiscono unicamente sulle cellule pruriginose dello stomaco e generano reazioni citoplasmatiche. Reazioni negative su rene e positive su stomaco sono indicative della presenza di AGPA.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Alcuni casi, i sierosi positivi per gli ANA possono essere molto deboli o negativi. La diluizione iniziale di screening (fenomeno prozona). In questi casi incerti, i sierosi dovrebbero essere analizzati in diluizioni maggiori e, se positivi, dovranno essere determinati in altri anticorpi.

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

Il coniugato FITC anti-gG umano come primo fornimento in questo kit è prevalente e specifico per le cellule pesanti ma presenta anche un certo livello con le cellule leggere. Reagisce maggiormente con gli autoanticorpi del classe gG, ma può, in misura inferiore, reagire con le cellule leggere di altre classi, ad esempio le gM.

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

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

VALORI ATTESI

Come si può vedere dalle tabelle 2, 3, 4 e 6 riportate. Il fine di questo documento, le analisi per gli anticorpi nucleari vengono usate per lo screening di LES e di alcuni altri disturbi immunologici. Gli AMA compaiono in più del 90% dei casi di cirrosi biliare primitiva e nel 3-11% dei casi di epatite cronica. Gli ASMA sono presenti nella maggior parte dei casi di epatite cronica e gli AGPA sono comunemente associati con i nematodi perniciosi e le glomerulonefriti croniche.

T

PERFORMANCE DEL TEST

Il test di Rilevazione di Autoanticorpi in immunofluorescenza Immuglo™ è stato confrontato con un test in fluorescenza disponibile in commercio che usa come substrato cellule epiteliali HEp-2. La comparazione ha incluso 15 campioni di siero di soggetti normoimmunologici sieropositivi con diagnosi di LES, di lupus eritematoso cutaneo subcutaneo, sclerodermia e reumatoidi. I sieri sono stati testati secondo le procedure e le diluizioni di screening consigliate dal produttore.

I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono:

Comparazione di Kit che utilizzano cellule epiteliali HEp-2 come Substrato per l'individuazione di Autoanticorpi

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

Il test di Rilevazione di Autoanticorpi in immunofluorescenza Immuglo™ (Sezioni di Rene/Somaco di topo) è stato confrontato con un altro test in fluorescenza disponibile in commercio che usa come substrato rene/somaco di topo. La comparazione ha incluso: 20 campioni di siero positivi agli ANA, 19 campioni di siero positivi agli AMA, 19 campioni di siero positivi agli ASMA, 20 campioni di siero positivi agli AGPA e 38 campioni di siero di soggetti normoimmunologici. I sieri sono stati testati a partire da una diluizione 1:10 secondo le procedure consigliate dal produttore. I risultati dei test sono riassunti nelle tabelle 7 e 8 riportate alla fine del presente documento.



SISTEMA DE TESTE DE AUTO-ANTICORPOS

IVD FOLHETO DO PRODUTO

REF	1102-60	60 Determina es
REF	1102	100 Determina es
REF	1102-20	120 Determina es
REF	1103	200 Determina es
REF	1103-240	240 Determina es
REF	1103-480	480 Determina es
REF	1103-512	512 Determina es
REF	1125	Rim de HEp-2/rato COMVI I 100 Determina es
REF	1125	Rim/est mago de HEp-2/rato COMVI II 100 Determina es

APLICAÇÃO

es es de n icorpos por imunofluorescência (F) p r de ecção e qu n ific ção dos n icorpos n i-nucle res (ANA) [REF] 1102, 1102-120, 1103, 1103-480, 1103-512, 1125, 1134, anticorpos n i-mi ocondri is (AMA), n icorpos n i-músculo liso (ASMA) [REF] 1125, 1134 e n icorpos n i-célul s p rie is gás ric s (AGPA) [REF] 1134 em soro hum no.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os Anticorpos Anti-nucleares (ANA), de ec dos por imunofluorescência indirec , uxili m o di gnós ico de p ologi s do ecido conjun ivo incluindo Lúpus eri em oso sis émico (LES), doenç mis do ecido conjun ivo, Síndrom de Sjögren e esclerodermi ¹⁻⁵. Os ANA presen m-se me cerc de 95% dos doen es LES bem como em doen es com ou r s doenç s do ecido conjun ivo. Os ANA mbém se podem presen r nou r s p ologi s is como hep i e crónic c iv e cirrose bili r primári ⁶⁻⁸.

Os Anticorpos Anti-mitochondriais (AMA) presen m-se em m is de 90% dos c sos com cirrose bili r primári , em 3 11% dos doen es com hep i e crónic c iv e es ão usen es nos doen es com obs rução bili r ex r -hepá ic e nou r s doenç s do fíg do. A presenç univers l de n icorpos n i-mi ocondri is n cirrose bili r primári e su usência vir u l em ic eríci ex r -hepá ic orn su de ecção de v lor considerável no di gnós ico diferenci ⁶⁻¹².

Os Anticorpos Anti-músculo liso (ASMA) em l íulo (>160) presen m-se n m iori dos c sos de hep i e crónic c iv e em íulos in ermédios (40-80) em hep i e vir l gud . Oc sion lmen e poderão presen r-se em c sos de cirrose bili r primári n qu l mbém se encon r m em íul ções in ermédi s. A impor ânci de íulos de 20-40 é mbígu vis o que es es íulos podem presen r-se em indivíduos norm is^{13,14}.

Os Anticorpos Anti-células parietais gástricas (AGPA) es ão norm lmen e ssoci dos nemi pernicios e g s ri e crónic rófic n s qu is se presen m em cerc de 90% e 50% dos c sos, respec iv men e. od vi , eles não são específicos d doenç pois podem presen r-se com pouc frequênci nou r s p ologi s. Apes r de os indivíduos s udáveis poderem er n icorpos con r s célul s p rie is gás ric s, su descober poderá reflec ir um g s ri e rófic ssin omá ic . A inexistência de n icorpos d s célul s p rie is gás ric s é um impor n e evidência p r exclusão de um nemi pernicios ¹⁵⁻¹⁷.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

No méodo de imunofluorescência indirec us do nes e ki , incub m-se os soros do doen e em diversos subs r os (célul s HEp-2 ou célul s HEp-2 e cor es de rim/esôm go de murg nho) p r permiti r lig ção dos n icorpos. Qu isquer n icorpos que não se enh m lig do são elimin dos por l v gem. Os n icorpos que se lig r m, d cl sse gG, são de ec dos r vés d incub ção do subs r o com conjug do de gG n i-hum n m rc do com fluoresceín . As re ções são observ d s com um microscópio de fluorescência equip do com fil ros dequ dos. A presenç de ANA, ASMA, AMA e AGPA é demons r d por um fluorescência verde-m çã de es ru ur s his ológic s específicos no ecido. Os íulos (o recíproco d m ior diluição que provocou um re ção posi v) são en ão de ermin d es ndo diluições em série ¹⁸.

INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO

Conservação e preparação

Conserve todos os re gen es en re 2 e 8 °C. Os re gen es es ão pron os us r depois de erem es biliz do emper ur mbien e.

P

Materiais fornecidos

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

Rim/esômago de HEp-2/rato COMVI I **REF** 1125

HEp-2/Rim e Esômago de rato COMVI II **REF** 1134

20 x	SORB SLD 6	Lâminas de substrato com 6 poços REF 1102-120)
6 x	SORB SLD 10	Lâminas de substrato com 10 poços REF 1102-60)
10 x	SORB SLD 10	Lâminas de substrato com 10 poços REF 1102, 1125, 1134)
20 x	SORB SLD 10	Lâminas de substrato com 10 poços REF 1103)
20 x	SORB SLD 12	Lâminas de substrato com 12 poços REF 1103-240)
40 x	SORB SLD 12	Lâminas de substrato com 12 poços REF 1103-480)
32 x	SORB SLD 16	Lâminas de substrato com 16 poços REF 1103-512)
1 x 0,5 ml	CONTROL + ANA *	Conrol positivo para ANA. Coném soro humano.
1 x 0,5 ml	CONTROL + AMA *	Conrol positivo para AMA. Coném soro humano. (1125, 1134)
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Conrol negativo. Coném soro humano.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Conjugado de IgG anti-humano com FITC. Proeger diluz. 1 vial (1102-60), 2 vials (1102, 1102-120, 1125, 1134), 3 vials (1103, 1103-240), 6 vials (1103-480, 1103-512)
1 x 60 ml	BUF *	Diluen e mpondo. 1 vial (1102-60, 1102, 1102-120, 1125, 1134) 2 vials (1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
2 x	BUF WASH	mpão fosforescente (PBS). Dissolver cada frasco em 1 l. 2 vials (1102-60, 1102, 1102-120, 1125, 1134) 3 vials (1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512)
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Meio de montagem. Não congelar. 1 vial (1102-60, 1102, 1125, 1134), 2 vials (1102-120, 1103), 3 vials (1103-240), 4 vials (1103-480, 1103-512)
1 x 12	COVER SLD	Lamelas. 1 box (1102-60, 1102), 2 boxes (1102-120, 1103), 3 boxes (1103-240, 1103-480)
1 x 12	COVER SLD LONG	Lamelas compridas (1125, 1134), 3 boxes (1103-512)

Componentes opcionais

1 x 1,0 ml **EVANS** Conrol seronegativo de Evans.

* Coném < 0,1% N₂

P

Smbolos utilizados nos r tulos:

LOT Número de lote

REF Número de catálogo

 Prazo de validade

 Temperatura de armazenamento

 Leia as instruções de utilização

IVD Utilização em diagnóstico *in vitro*

 Fabricante

 Número de testes

Material necessário mas não fornecido

- Microscópio de fluorescência
- Micropipete ou pipete de P s eur
- Pipetas serológicas
- Recipiente de coloração (ex: Coplin)
- Tubos de ensaio pequenos (ex.: 13 x 75 mm) e suportes para tubos de ensaio
- Água destilada ou desionizada
- Recipiente de 1 litro
- Frasco de lavagem
- Luvas de papel
- Câmara de incubação

AVISOS E PRECAUÇÕES

Para uso em diagnóstico *in vitro* todos os componentes de origem humana utilizados foram testados para HbsAg, VHC, V H-1 e 2 e H LV- e deram resultado negativo nos testes requeridos pelo FDA. Todos os materiais de soro humano e produtos de origem humana devem ser tratados como sendo potencialmente perigosos, independentemente de sua origem. Devem-se respeitar todos os procedimentos de conservação, distribuição e eliminação de resíduos¹⁹.

AVISO: A zida de sódio (N N₃) pode reagir com substâncias contendo cobre ou chumbo e formar zidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminados os líquidos deve ser evitado que se formem zidas de água para evitar formação dessas zidas. A zida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o diretor de laboratório ou um Centro Anti-Venenos.

As instruções devem ser seguidas à risca de forma a assegurar resultados válidos. Não tocar componentes dos kits com ouros de outros reagentes do mesmo número de catálogo de Immco Diagnósticos. Não utilize se estes estiverem fora do prazo de validade.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Nessas operações só devem ser usados materiais de soro. As amostras muito hemolisadas, lipêmicas ou contaminadas com micróbios podem interferir no rendimento dos testes e não devem ser usadas. Conservar em 2 e 8 °C por não mais de um mês. Para um armazenamento prolongado devem ser congeladas a -20 °C. Evitar congelamentos e descongelamentos repetidos.

PROCEDIMENTO

Método do teste

A. Despiste

1. Dilua cada soro do doente 1:10 (20 µl de soro + 180 µl de diluente) dilua cada soro do doente a 1:40 (10 µl de soro + 390 µl de diluente). Não dilua os Controles Negativo e Positivo. Conserve o soro não diluído para determinar o título de anticorpos, se os testes de controle forem positivos.
2. Deixe que as bolsas com as lâminas de substrato se estabilizem à temperatura ambiente por 10-15 minutos. Retire as lâminas com atenção sem ocorrer no substrato.
3. Role as lâminas e coloque-as na câmara de incubação revestida com o lentes de papel humedecidos com água para evitar secagem.
4. Inverter o frasco contendo o soro e delicadamente aplicar 1 gota de Controlo Positivo ANA no poço nº 2. Se aplicável, deite 1 gota de Controlo Positivo AMA no poço nº 3. (1125, 1134). Evite encher demais os poços.
5. Com um micropipeta ou pipeta de Pasteur, deite 1 gota do soro diluído do doente (cerca de 50 µl) nos outros poços. Evite encher demais os poços.
6. Coloque rapidamente na câmara de incubação e incube as lâminas 30 minutos à temperatura ambiente.
7. Retire a lâmina da câmara de incubação. Segure a lâmina pelo extremo de onde se encontra o círculo de 10 ml de PBS usando um pipeta, ou leve a lâmina num provedor com PBS. Não use o frasco de lavagem. Enxágue imediatamente a lâmina para o recipiente de Coplin e leve 10 minutos. Repita o procedimento em todas as lâminas restantes.
8. Retire (s) a lâmina (s) do recipiente de Coplin. Passe o bordo da lâmina num lenço de papel para eliminar o excesso de PBS.
Coloque a lâmina na câmara de incubação. Inverter imediatamente o frasco contendo o soro do Conjugado e leve ligeiramente para deitar 1 gota (proximamente 50 µl) em cada poço.
9. Repita os passos 7 e 8 em cada lâmina.
10. Coloque rapidamente na câmara de incubação. Incube por 30 minutos à temperatura ambiente.
11. Retire uma lâmina da câmara de incubação. Segure a lâmina num ponto e mergulhe-a num recipiente com PBS para eliminar o excesso de conjugado. Coloque (s) a lâmina (s) num recipiente de coloração com PBS durante 10 minutos. Se optar por usar conjugado sem corante (consultar componentes opcionais na seção Materiais fornecidos), poderá adicionar 2-3 gotas de corante azul de Evans à lavagem final. Repita o procedimento nas lâminas restantes. NOTA: Um lavagem incorreta pode levar a um aumento da fluorescência de fundo.
12. Retire a lâmina do recipiente de coloração. Passe as lâminas num lenço de papel para eliminar o excesso de PBS. **Para evitar que a lâmina seque, salte imediatamente ao passo seguinte enquanto a lâmina ainda está húmida.**
13. Monte o microscópio aplicando **3 gotas** de Meio de Montagem uniformemente no lentes e colocá-las sobre a lâmina. Não faça muita pressão e evite o deslizamento do lentes.
14. Repita os passos 12 e 13 em cada lâmina.
15. Examine a fluorescência específica com microscópio de fluorescência com aumento de 200x ou mais.

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

P

B. Determinação final (titulação)

Um soro positivo no teste de controle pode indicar ser mais específico seguindo os passos 5 a 13 para determinar a titulação. Controle deve incluir os Controles Positivo e Negativo. Efectue diluições em série e em duplicado partindo de 1:10. O recíproco da maior diluição que provoca uma reação positiva é a titulação.

Preparação de diluições em série começando em 1:10

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

Tubos	1	2	3	4	5	6
Soro	0,1 ml					
	+					
Diluente tampão	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
Transferir	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
Diluição final	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

CONTROLE DE QUALIDADE

Os Controles Positivo e Negativo devem ser incluídos em cada teste. O Controle Negativo não deverá apresentar uma fluorescência específica do núcleo, músculo liso, túbulos do rim ou células epiteliais glomerulares. O Controle Positivo AMA deve ser um infiltrado de coloração 2+ ou superior dos túbulos do rim. O Controle Positivo ANA deve ser um infiltrado de coloração 2+ ou superior do núcleo do rim com um padrão homogêneo predominante.

Se não se observarem os resultados esperados, o teste deve ser repetido. Se resultados inadequados com inuente ocorrerem com os controles, pode ocorrer-se de:

- Contaminação. Elimine e use outro controle.
- Problemas no sistema óptico do microscópio de fluorescência: Estes incluem: alinhamento incorreto, lâmpada precisa de ser mudada, etc.
- A lâmina secou durante o processo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados dos testes para anticorpos ANA, AMA, ASMA e AGPA devem ser apresentados como negativos (com título inferior a 10), em seções do epitélio do rim (1125, 1134) negativo (<40) nas pilhas HEp-2 (1102-60, 1102-120, 1103, 1103-240, 1103-480, 1103-512, 1125, 1134) positivos (com título igual ou superior a 320) ou, em lâmina ínter, positivos com título de ponto final específico.

Leituras dos campos que contêm coloração específica do núcleo das células do rim e células HEp-2 e o padrão observado para ANA, os túbulos do rim para AMA, as redes dos vasos sanguíneos do rim para ASMA e as células epiteliais glomerulares para AGPA. Todos os resultados devem ser registrados como negativos para ANA, AMA, ASMA e/ou AGPA.

Os ANA podem ser detectados em todos os subtipos e devem ser quantitativos das células do rim ou células HEp-2. Os padrões de coloração nuclear observáveis com o subtipo de rim ou com as células HEp-2 fornecidas incluem homogêneos, periféricos (marginais), mosqueados e nucleolares. O padrão de coloração dos cenómeros (incluindo as figuras microscópicas) presentes em células HEp-2. Estes padrões de coloração nuclear são basicamente descritivos. Esses poderão ser isolados ou um combinação de diversos padrões de coloração. Os últimos são devidos a reações múltiplas e diferentes tipos de reações.

Homogênea: todo o núcleo adquire fluorescência uniformemente com um padrão de coloração difuso.

Membranous nuclear: A membrana nuclear mancha o mais intensa como o teste padrão muito bem linear com intensidade de mancha de diminuição do nucleoplasm para o centro do núcleo

PT

- Mosqueada:** Alguns m nch s discret s, de grosseir s fin s, dquirem fluorescênci por todo o núcleo.
- Nucleolar:** A color ção dos nucléolos como corpos sólidos múltiplos dentro dos núcleos.
- Centr meros:** M nch s gr ndes em qu ntid de limit d . Os ntigénios re ctivos sep r m-se com cromossom s condens dos em célul s submetid s mitose.

A especificid de de lguns dos nticorpos, que present m os p drões de color ção cim , poderá ser m is bem identific d por testes de nticorpos nADN e diversos ntigénios nucle res extr íveis. Esses podem ter importânci di gnóstic como indic dos n tabela 1, no fim deste documento.

Os AMA poderão ser observ dos em mbos os túbulos, dist is e proxim is, do rim dquirindo os túbulos dist is um color ção m is brilh nte. Embora o citopl sm d s célul s p riet is gástric s t mbém dquir color ção, os AMA devem ser qu ntific dos no rim.

T mbém se poderá observ r color ção dos músculos do estôm go e dos glomérulos do rim com ASMA, m s só deverão ser regist dos os ASMA observ dos n s p redes dos v sos s nguíneos do rim.

N s célul s HEp-2, os nticorpos citopl smáticos detectáveis incluem nticorpos nti-mitocondri is (AMA) e os nticorpos nti-músculo liso (ASMA). Num p drão AMA, o citopl sm present -se gr nul r, enq nto o p drão ASMA é um rede fibril r de color ção por todo o citopl sm . Ambos os p drões devem ser regist dos como neg tivos p r ANA. Os AGPA só re gem n s célul s p riet is do estôm go e provoc m re ções citopl smátic s. As re ções neg tiv s no rim com re ções positiv s no estôm go são indic tiv s de AGPA.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

N lguns c sos, o soro positivo ANA poderá t mbém ser muito fr co ou neg tivo n diluição de controlo inici l (fenómeno pró-zon). Nesses c sos duvidosos o soro deve ser control do em diluições m is elev d s e, se positivo, determin do o título dos nticorpos.

N lguns c sos presenç de dois ou m is nticorpos num soro os qu is sej m re ctivos com o mesmo substr to pode provoc r um interferênci n su detecção por imunofluorescênci . Est interferênci poderá provoc r f lt de detecção de ANA ou supressão d su titul ção se o nticorpo de interferênci tiver um titul ção superior ANA. Deverão ser regist d s tod s s re ções ANA.

O Conjug do de gG de c br nti-hum n com F TC, fornecido com este kit, é princip lmente específico de c dei pes d m s tem um ligeir ctivid de de c dei leve. Esse re ge princip lmente com uto- nticorpos de cl sse gG, m s pode, um gr u inferior, re gir com c dei s leves de outr s cl sses, t is como gM.

Um ANA positivo não deverá ser consider do, por si só, como di gnóstico de LES. T mbém se present m em doentes com outr s doenç s do tecido conjuntivo e lguns medic mentos t is como proc in mid e hidr l zin podem provoc r um result do ANA positivo¹. P r lém disso, o soro de doentes com doenç s infeccios s e m lign s t mbém pode d r ANA positivo²⁰.

Qu ndo redigir um di gnóstico, o médico deve consider r os result dos de todos os testes de imunofluorescênci indirect positivos em conjunto com os result dos de outros testes de l bor tório e condição clínic do doente.

VALORES PREVISTOS

Como indic do n s T bel s 2, 3, 4 e 6 no fim deste documento, os testes p r nticorpos nucle res são us dos p r despiste de LES e de outr s p tologi s imunológic s. Os AMA present m-se em m is de 90% dos c sos de cirrose bili r primári e em 3 11% dos c sos de hep tite crónic . Os ASMA present m-se n m iori dos c sos de hep tite crónic ctiv e os AGPA são norm lmente ssoci dos nemi pernicios e g strite crónic trófic .

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O Sistem de Teste de Auto- nticorpos ImmuGlo™ foi comp r do com outro teste de nticorpos fluorescentes obtido no comércio us ndo célul s HEp-2 como substr to. A comp r ção incluiu 15 mostr s de soro de indivíduos s udáveis bem como soro de doentes com di gnóstico de LES, Lúpus eritem toso cutâneo sub gudo,

PT

esclerodermi ou artrite reumatóide. Os soros foram testados de acordo com o método e diluição de controle recomendados pelo fabricante. Estes resultados comparados obtidos estão abaixo resumidos:

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

Condição Clínica	N. de Soro	Positivo	
		Immco™	Outro
LES	12	100	100
LE Cutâneo subagudo (LECS)	7	85	85
Esclerodermi	6	100	100
Artrite Reumatóide	10	50	30
Controles Normais	15	0	0

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

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 33: 167-240, 1982.
2. Kumar V, Beutner EH and Chorzelski TP. Autoimmunity of the skin. In "Concepts in Immunopathology", Vol 1, Cruse JM and Lewis RE Jr, Eds, Karger, Basel, 318-353, 1985.
3. Reimer G, Cornell RC and Tan EM. The biochemical nature of nuclear antigens reactive with antinuclear antibodies. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 519-531, 1987.
4. Beutner EH, Kumar V, Krusny SA and Chorzelski TP. Standardization of antinuclear antibody and other immunofluorescent tests used in immunopathologic studies of the skin. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 41-64, 1987.
5. Tan EM, Chen EKL, Sullivan KF and Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): Diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 47: 121-141, 1988.
6. Manns M, Gerken G, Kyriakoulis A and Meyer zum Büschenfelde KH. Significant autoimmune markers of autoimmune liver disorders: Current status. *J Clin Lab Anal* 1: 362-370, 1987.
7. Mackay R. Autoimmunity and the liver. *Clin Aspects Immunity* 2: 8-17, 1988.
8. McMillan SA, Alderdice JM, McKee CM et al. Diversity of autoantibodies in patients with anti-mitochondrial antibody and their diagnostic value. *J Clin Pathol* 4: 232-236, 1987.
9. Gershwin ME, Coppel RL and Mackay R. Primary biliary cirrhosis and mitochondrial autoantigens - insights from molecular biology. *Hepatology* 8: 147-151, 1988.
10. Berg PA and Klein R. Mitochondrial antigens and autoantibodies from anti-M1 to anti-M9. *Klin Wochenschr* 64: 897-909, 1986.
11. Popper H and Ponzetto F. Clinic, histologic and immunopathologic features of primary biliary cirrhosis. *Springer Semin Immunopathol* 3: 339-354, 1980.
12. Berg PA and Bacon H. Serology of primary biliary cirrhosis. *Springer Semin Immunopathol* 3: 355-373, 1980.
13. Anderson P, Smith JV and Sobieszek A. Studies on the specificity of smooth muscle antibodies. *Clin Exp Immunol* 22: 22-29, 1975.
14. Kurki P, Miettinen A, Linder E, Pikkariinen P, Vuorio M and Silspuro MP. Different types of smooth muscle antibodies in chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis: Their diagnostic and prognostic significance. *Gut* 21: 878-884, 1980.
15. Fisher JB and Taylor KB. The significance of gastric antibodies. *Brit J Hematol* 20: 1-7, 1971.
16. Chisholm M. Immunology of gastritis. *Clin Gastroenterol* 5: 419-428, 1976.
17. Bigazzi PE, Burek CL and Rose NR. Antibodies to tissue-specific endocrine, gastrointestinal and neurologic antigens. In "Manual of Clinical Laboratory Immunology". Rose NR, Friedman H and Frey JL, Eds, American Society for Microbiology, Washington DC, 762-770, 1986.
18. Beutner EH, Kumar V, Krusny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 3-40, 1987.
19. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1999 [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395].
20. Nisengard RJ. Antinuclear antibodies: Significance of titers. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Ben S, Eds, John Wiley and Sons, New York, 2nd Ed, 387-398, 1979.

21. Meyer zum Büschenfelde KH, Manns M and Trutmann F. Autoimmunity in chronic liver diseases - relationship to SLE? In "Recent Advances in Systemic Lupus Erythematosus". Lambert PH, Perrin L, and Zui S, Academic Press, New York, 259-269, 1984.
22. Walker JG, Doniach D, Roitt M and Sherlock S. Serologic tests in the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1: 827, 1965.
23. Pironetto F and Popper H. Hetero-isotopic autoimmune phenomenon in the liver. In "Textbook of Immunopathology", Miescher PA and Müller-Eberhard HJ, Eds, Grune and Stratton, New York, 2nd Ed, 789-817, 1976.
24. Leung PSC, Manns MP, Coppel RL, Gershwin ME. Detection of anti-mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis and liver-kidney microsomal antibodies in autoimmune hepatitis. In "Manual of Clinical Laboratory Immunology", Rose NR, Hamilton RG, Detrick B, Eds, ASM Press, Washington DC, 6th Ed, 1023-1031, 2002.
25. Muratori P et al. Smooth muscle antibodies and type 1 autoimmune hepatitis. *Autoimmunity*. 35 (8): pp. 497-500. 2002.
26. Gtselis NK et al. Autoantibodies in HCV-treated patients. *World J Gastroenterol*. 11(4):482-487.2005.
27. Miller MH et al. Clinical comparison of cultured human epithelial cells and rat liver as substrates for the fluorescent antinuclear antibody test. *J Rheumatol*. 12 (2): 265-9. 1985.

Table 1. Diagnostic Significance of Antinuclear Antibodies

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

*Mixed Connective Tissue Disease

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Adapted from Anderson P, et al.¹³

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

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

Table 7. Findings in Positive Sera

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

Table 8. Findings in Normal Controls

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



For technical assistance please contact:

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST

E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, nc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com