



# AUTOANTIBODY TEST SYSTEM

IVD

## PRODUCT INSERT

**REF** 1100 Mouse Liver Substrate 48 Determinations

**REF** 1107 COMVI Mouse Kidney/Stomach Substrate 48 Determinations

**REF** 1136 COMVI-III Mouse Kidney/Stomach/Liver Substrate 48 Determinations

**REF** 1136-96 COMVI-III Mouse Kidney/Stomach/Liver Substrate 96 Determinations

### INTENDED USE

Indirect immunofluorescence (IF) antibody tests for the detection and quantitation of anti-nuclear antibodies (ANA) **REF** 1100, 1107, 1136, 1136-96 anti-mitochondrial antibodies (AMA), anti-smooth muscle antibodies (ASMA), anti-gastric parietal cell antibodies (AGPA) **REF** 1107, 1136, 1136-96

### 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 <sup>1-5</sup>. 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 <sup>6-8</sup>.

**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 <sup>6-12</sup>.

**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 <sup>13,14</sup>.

**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 <sup>15-17</sup>.

### PRINCIPLES OF PROCEDURE

In the indirect immunofluorescence method used in these kits, patients' sera are incubated on mouse kidney/stomach or mouse kidney/stomach/liver sections to allow binding of antibodies to the tissue substrate. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of ANA, ASMA, AMA, 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 of the serum <sup>18</sup>.

### 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**

**REF** 1100 Mouse Liver Substrate 48 Determinations

**REF** 1107 COMVI Mouse Kidney/Stomach Substrate 48 Determinations

**REF** 1136 COMVI-III Mouse Kidney/Stomach/Liver Substrate 48 Determinations

**REF** 1136-96 COMVI-III Mouse Kidney/Stomach/Liver Substrate 96 Determinations

6 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>8</b>	8 well Substrate Slides, <b>REF</b> (1100, 1107, 1136)
12 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>8</b>	8 well Substrate Slides, <b>REF</b> (1136-96)
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>ANA</b> *	ANA Positive Control. Contains human serum.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>AMA</b> *	AMA Positive Control. Contains human serum.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>-</b> *	Negative Control. Contains human serum.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> * †	Anti-human IgG FITC Conjugate. Protect from light <b>REF</b> (1136-96 contains 2x5ml)
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> <b>EB</b> *	Anti-human IgG FITC Conjugate containing Evan's Blue. Protect from light. (1136-96EB contains 2x5ml)
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	Buffered Diluent.
2 vials	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	Phosphate Buffered Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter.
1 x 5,0 ml	<b>MOUNTING</b> <b>MEDIUM</b> *	Mounting Medium. Do not freeze.
1 x 1.0 ml	<b>EVANS</b>	<b>REF</b> Evan's Blue Counterstain.
1 x 12	<b>COVER</b> <b>SLD</b>	Coverslips

\* Contains < 0.1% NaN<sub>3</sub>

† Kits with an "x" after the part number contain this component in place of **IgG-CONJ** **FITC** **EB**


**Symbols used on labels:**

**LOT** Lot number

**REF** Catalog number

 Use by

 Storage temperature

 Read instructions for use

**IVD** In vitro diagnostic use

 Manufacturer

 Number of Tests

EN

### **Material required but not provided**

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

### **WARNINGS AND PRECAUTIONS**

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HbsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regard-less of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials<sup>19</sup>.

**WARNING** - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) 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 (Code 1107, 1136, 1136-96) with the Buffered Diluent provided (20 µl serum + 180 µl diluent) or 1:20 (Code 1100) (10 µl serum + 190 µl diluent). Do not dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for 10-15 minutes. Carefully remove the slides without touching the substrate.
3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Invert dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl) of the Negative Control to well #1. Similarly apply 1 drop of ANA Positive Control to well #2. If applicable, 1 drop of AMA Positive Control to well #3. (Code 1107, 1136, 1136-96) Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur Pipette, apply 1 drop of patient's diluted serum (approximately 50 µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides 30 minutes at room temperature.
7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately 10 ml PBS using a pipette, or rinse slide in beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash 10 minutes. Repeat process with all remaining slides.

EN

8. Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the Conjugate dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 µl) to each well.
9. Repeat steps **7 and 8** for each slide.
10. Replace the lid on the incubation chamber. Incubate 30 minutes at room temperature.
11. Remove a slide from incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for 10 minutes. If optional conjugate without counterstain is used (see optional components in Materials Provided Section), 2-3 drops of Evan's Blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.
12. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **To prevent slide from drying, proceed immediately with next step while slide is still wet.**
13. Mount the coverslip by applying **3 drops** of Mounting Medium evenly on the coverslip and place coverslip over slide. Avoid applying undue pressure and prevent lateral movement of the coverslip.
14. Repeat steps 12 and 13 for each slide.
15. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater.

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

#### B. Endpoint Determination (titration)

A serum positive in the screening test may be further tested following steps 5 through 13 to determine the titer. Each test run should include the Positive and Negative Controls. Make serial two-fold dilutions starting at 1:10 (Code 1107, 1136, 1136-96) or 1:40 (Code 1100). The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

#### Preparation of Serial Dilutions

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:

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

#### QUALITY CONTROL

Both a Positive and Negative Control should be included with each test run. The negative control should show no specific fluorescence. The AMA Positive Control should have 2+ or greater staining intensity of the tubules of the kidney. The ANA Positive Control should have 2+ or greater staining intensity of the nuclei of the kidney and liver 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, AGPA, antibodies should be reported as negative (< 10) on kidney and stomach sections (Code 1107, 1136, 1136-96), negative (<20) on liver sections (Code 1100) or alternatively positive with titer.

Read only fields which contain specific staining of the nuclei for ANA, the kidney tubules for AMA, the blood vessel walls for ASMA, 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 fluorescence throughout the nucleus.

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

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.

## 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.

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 ANA<sup>1</sup>. Moreover, sera of patients with malignancies and infectious diseases may also have positive ANA. 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 1, 2, 3, 4 and 5 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.<sup>18,20</sup>

EN

### **PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

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 6 and 7 at the end of this document.

Sera obtained from 96 normal subjects, 21 patients with SLE, 17 patients with scleroderma and 20 patients with rheumatoid arthritis were tested on the antinuclear antibody (ANA) test (mouse liver sections) kit and other commercially available ANA kits. Sera were tested according to the procedure and screening dilution recommended by the manufacturers. These yielded comparable results as indicated in Table 8.



**IMMCO**  
DIAGNOSTICS

## ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

IVD

### ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

**REF** 1100 Υπόστρωμα στομάχου ποντικού 48 Προσδιορισμοί

**REF** 1107 Υπόστρωμα νεφρού/στομάχου ποντικού COMVI 48 Προσδιορισμοί

**REF** 1136 Υπόστρωμα νεφρού/στομάχου/ήπατος ποντικού COMVI-III 48 Προσδιορισμοί

**REF** 1136-96 Υπόστρωμα νεφρού/στομάχου/ήπατος ποντικού COMVI-III 96 Προσδιορισμοί

### ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Αναλύσεις αντισωμάτων έμμεσου ανοσοφθορισμού (IF), για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) **REF** 1100, 1107, 1136, 1136-96, αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων (AMA), αντισωμάτων κατά των λείων μυϊκών ινών (ASMA), αντισωμάτων κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου (AGPA) **REF** 1107, 1136, 1136-96

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Τα **αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)**, που ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό, συμβάλλουν στη διάγνωση διαταραχών του συνδετικού ιστού στις οποίες περιλαμβάνονται ο συστηματικός ερυθρεμάτης (ΣΕΛ), η μικτή νόσος του συνδετικού ιστού, το σύνδρομο Sjögren και η σκληροδερμία<sup>1-5</sup>. Τα αντισώματα ANA εμφανίζονται στο 95% των ασθενών με ΣΕΛ, καθώς επίσης και σε άλλες νόσους του συνδετικού ιστού. Τα ANA ενδέχεται επίσης να εμφανιστούν και σε άλλες διαταραχές, όπως η χρόνια ενεργός ηπατίτιδα και η πρωτοπαθής χολική κίρρωση.<sup>6-8</sup>.

Τα **αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA)** εμφανίζονται σε ποσοστό άνω του 90% των περιπτώσεων πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης, στο 3-11% των ασθενών με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα, ενώ απουσιάζουν σε ασθενείς με εξωηπατική απόφραξη χοληφόρων και άλλες νόσους του ήπατος. Η καθολική παρουσία αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση και η ουσιαστική απουσία τους στον εξωηπατικό ίκτερο, καθιστά την ανίχνευση ιδιαίτερα πολύτιμη για τη διαφορική διάγνωση.<sup>6-12</sup>.

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 εμφανίζονται σε τίτλους μετρίου βαθμού. Η αξία των τίτλων 20-40 είναι αμφίβολη, καθώς αυτοί οι τίτλοι ενδέχεται να εμφανιστούν σε φυσιολογικά άτομα.<sup>13,14</sup>.

Τα **αντισώματα κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου (AGPA)** συσχετίζονται 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 σε μικρή 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 αναιμίας.<sup>15-17</sup>.

### ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Στη μέθοδο έμμεσου ανοσοφθορισμού που χρησιμοποιείται σε αυτά τα kit, οι οροί των ασθενών επωάζονται σε τομές νεφρού/στομάχου ποντικού ή νεφρού/στομάχου/ήπατος ποντικού, προκειμένου να επιτευχθεί δέσμευση των αντισωμάτων στο υπόστρωμα ιστού. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύονται απομακρύνονται με έκπλυση. Τα αντισώματα τάξης IgG που έχουν δεσμευθεί ανιχνεύονται με την επώαση του υποστρώματος με συζευκτικό αντίσωμα σημασμένο με φλουορεσκεΐνη. Οι αντιδράσεις παρακολουθούνται με μικροσκόπιο φθορισμού που διαθέτει τα κατάλληλα φίλτρα. Η παρουσία ANA, ASMA, AMA, AGPA διαπιστώνεται με την παρουσία φθορισμού έντονου πράσινου χρώματος, σε συγκεκριμένες ιστολογικές δομές του ιστού. Στη συνέχεια, καθορίζονται οι τίτλοι (το αντίστροφο της υψηλότερης αραιώσης που έδωσε θετική αντίδραση) με ανάλυση διαδοχικών αραιώσεων του ορού.<sup>18</sup>

EL

### ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ Φύλαξη και προετοιμασία

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

#### Υλικά που παρέχονται

Υπόστρωμα συκωτιού ποντικών **REF** 1107

Υπόστρωμα νεφρού/στομάχου ποντικού COMVI **REF** 1107

Υπόστρωμα νεφρού/στομάχου/ήπατος ποντικού COMVI-III **REF** 1136

Υπόστρωμα νεφρού/στομάχου/ήπατος ποντικού COMVI-III **REF** 1136-96

Το kit περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 48 προσδιορισμών.

6 x	<b>SORB SLD 8</b>	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος με 8 κυψελίδες <b>REF</b> (1100, 1107, 1136)
12 x	<b>SORB SLD 8</b>	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος με 8 κυψελίδες <b>REF</b> (1136-96)
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL + ANA</b> *	Διάλυμα θετικού ελέγχου για ANA. Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL + AMA</b> *	Διάλυμα θετικού ελέγχου για AMA. Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ FITC</b> * †	Συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης IgG συζευγμένο με FITC. Να προστατεύεται από το φως <b>REF</b> (1136-96 contains 2x5ml)
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ FITC EB</b> *	Συζευκτικό αντίσωμα FITC κατά της ανθρώπινης IgG με χρωστική Evans Blue. Να προστατεύεται από το φως. (1136-96EB contains 2x5ml)
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	Αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα.
2 φιαλίδια	<b>BUF WASH</b>	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Διαλύστε κάθε φιαλίδιο έως όγκο 1 λίτρου.
1 x 5,0 ml	<b>MOUNTING MEDIUM</b> *	Μέσο επικάλυψης. Να μην καταψύχεται.
1 x 1,0 ml	<b>EVANS</b>	<b>REF</b> Επίχρωση Evans blue.
1 x 12	<b>COVER SLD</b>	Καλυπτρίδες.

\* Περιέχει < 0,1% NaN<sub>3</sub>

† εξαρτήσεις με ένα " x" μετά από τον αριθμό μερών περιέχετε αυτό το συστατικό αντί IgG-CONJ FITC EB


#### Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

**LOT** Αριθμός παρτίδας

**REF** Αριθμός καταλόγου

 Ημερομηνία λήξης

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης

**IVD** In vitro διαγνωστική χρήση

 Κατασκευαστής

 Αριθμός αναλύσεων

**Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται**

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

**ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ**

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HbsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Όλα τα δείγματα ανθρώπινου ορού και τα προϊόντα ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα, ανεξάρτητα από την προέλευσή τους. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών<sup>19</sup>.

**ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ** – Το αζίδιο του νατρίου (NaN<sub>3</sub>) 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. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του kit με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης.

**ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί 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 θερμοκρασία 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. Διαλογή**

1. Αραιώστε τον ορό κάθε ασθενούς σε αναλογία 1:10 (1107, 1136, 1136-96) με το αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχεται (20 μl ορού + 180 μl διάλυμα αραιώσης) ή 1:20 (κώδικας 1100) (10 μl ορός + 190 μl diluent). Μην αραιώνετε τα διαλύματα θετικού ή αρνητικού ελέγχου. Φυλάξτε τους αδιάλυτους 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 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 του διαλύματος

αρνητικού ελέγχου στην κυψελίδα υπ' αρ. 1. Με τον ίδιο τρόπο, προσθέστε 1 σταγόνα διαλύματος θετικού ελέγχου ANA στην κυψελίδα υπ' αρ. 2. Εάν εφαρμόζεται, προσθέστε 1 σταγόνα διαλύματος θετικού ελέγχου AMA στην κυψελίδα υπ' αρ. 3. (1107, 1136, 1136-96) 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 ποτήρι ζέσεως που περιέχει PBS. Μη χρησιμοποιείτε φιάλη έκπλυσης. Μεταφέρετε την αντικειμενοφόρο αμέσως στο δοχείο Corlin και εκπλύνετε επί 10 λεπτά. Επαναλάβετε τη διαδικασία με όλες τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους.
8. Αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους από το δοχείο Corlin. Στυπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. Τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο σε θάλαμο επώασης. Αναστρέψτε αμέσως το σταγονόμετρο με το συζευκτικό αντίσωμα και πιέστε το μαλακά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 µl) σε κάθε κυψελίδα.
9. Επαναλάβετε τα βήματα **7 και 8** για κάθε αντικειμενοφόρο.
10. Τοποθετήστε εκ νέου το καπάκι στο θάλαμο επώασης. Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εμβαπίστε την σε ένα ποτήρι ζέσεως με PBS για να αφαιρέσετε την περίσσεια συζευκτικού αντισώματος. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε ένα δίσκο χρώσης που έχει πληρωθεί με PBS επί 10 λεπτά. Εάν χρησιμοποιηθεί προαιρετικό συζευκτικό αντίσωμα χωρίς επίχρωση (δείτε τα προαιρετικά συστατικά στην ενότητα "Υλικά που παρέχονται"), μπορείτε να προσθέσετε 2-3 σταγόνες επίχρωσης Evans blue στην τελική έκπλυση. Επαναλάβετε για τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τυχόν ακατάλληλη έκπλυση ενδέχεται να προκαλέσει αυξημένο φθορισμό υποβάθρου.
12. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το τρυβλίο 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 ενώ η αντικειμενοφόρος είναι ακόμη υγρή.**
13. Εφαρμόστε την καλυπτρίδα, προσθέτοντας **3 σταγόνες** μέσου επικάλυψης ομοιόμορφα επάνω στην καλυπτρίδα και τοποθετήστε την πάνω στην αντικειμενοφόρο. Αποφύγετε την εφαρμογή άσκοπης πίεσης και αποτρέψτε την πλευρική πίεση της καλυπτρίδας.
14. Επαναλάβετε τα βήματα **12 και 13** για κάθε αντικειμενοφόρο.
15. Εξετάστε για ειδικό φθορισμό με μικροσκόπιο φθορισμού σε μεγέθυνση 200x ή μεγαλύτερη.

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

## **B. Προσδιορισμός τελικού σημείου (τιτλοδότηση)**

Ένα ορός που θα βρεθεί θετικός στην ανάλυση διαλογής μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω, ακολουθώντας τα βήματα 5 έως 13 για να καθοριστεί ο τίτλος του. Κάθε σειρά ανάλυσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τα διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου. Εκτελέστε διαδοχικές διπλές αραιώσεις ξεκινώντας από την αναλογία 1:10. (κώδικας: 1107, 1136, 1136-96) or 1:40 (κώδικας: 1100) Ο τίτλος είναι το αντίστροφο της υψηλότερης αραιώσης που έδωσε θετική αντίδραση.

## **Προετοιμασία των διαδοχικών αραιώσεων**

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 ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κάθε ανάλυση θα πρέπει να περιλαμβάνει τόσο ένα διάλυμα θετικού όσο και ένα διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου θα πρέπει να μην παρουσιάζει ειδικό φθορισμό. Το διάλυμα θετικού ελέγχου AMA θα πρέπει να παρουσιάζει ένταση φθορισμού των νεφρικών σωληναρίων 2+ ή μεγαλύτερη. Το διάλυμα θετικού ελέγχου ANA θα πρέπει να παρουσιάζει ένταση φθορισμού των πυρήνων των νεφρικών και ηπατικών κυττάρων 2+ ή μεγαλύτερη, με κυρίως ομοιογενές πρότυπο.

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

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

### ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων για τα αντισώματα ANA, AMA, ASMA, AGPA θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικά (< 10), Στα τμήματα στομαχίων νεφρών (κώδικας: 1107, 1136, 1136-96) αρνητικά (< 20) στα τμήματα συκωτιού (κώδικας: 1100) ή εναλλακτικά θετικός με τον τίτλο.

Διαβάστε μόνο πεδία τα οποία περιλαμβάνουν ειδική χρώση των πυρήνων για τα ANA, των νεφρικών σωληναρίων για τα AMA, των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων για τα ASMA, των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου για τα AGPA. Όλες οι άλλες αντιδράσεις θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικές για ANA, AMA, ASMA, Στα τμήματα στομαχίων νεφρών (κώδικας: 1107, 1136, 1136-96) αρνητικά (< 20) στα τμήματα συκωτιού (κώδικας: 1100) ή εναλλακτικά θετικός με τον τίτλο.

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 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 μειωμένη 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.

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.

EL

Τα AMA μπορούν να παρατηρηθούν τόσο στα άπω όσο και στα εγγύς νεφρικά σωληνάρια, με εντονότερη τη χρώση στα άπω σωληνάρια. 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.

### **ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ**

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οροί θετικοί για ANA ενδέχεται να είναι πολύ ασθενείς ή αρνητικοί στην αρχική αραιώση διαλογής (φαινόμενο προζώνης). Σε τέτοιες αμφίβολες περιπτώσεις, οι οροί θα πρέπει να εξετάζονται σε υψηλότερες 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. 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 προκαΐναμίδη και η υδραλαζίνη ενδέχεται να επάγουν ένα θετικό αποτέλεσμα ANA<sup>1</sup>. Επιπλέον, οροί ασθενών με κακοήθειες και λοιμώδεις νόσους ενδέχεται να έχουν επίσης θετικό αποτέλεσμα ANA. Ο κλινικός ιατρός θα πρέπει να εξετάσει τα αποτελέσματα όλων των θετικών αναλύσεων έμμεσου ανοσοφθορισμού σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα άλλων εργαστηριακών εξετάσεων και την κλινική κατάσταση του ασθενούς, προκειμένου να καταλήξει σε διάγνωση.

### **ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ**

Όπως φαίνεται στους πίνακες 1, 2, 3, 4 και 5 στο τέλος αυτού του εντύπου, οι αναλύσεις για πυρηνικά 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 ΑΠΟΔΟΣΗΣ**

Το σύστημα ανάλυσης αυτοαντισωμάτων ImmuGlo™ (τομές νεφρού/στομάχου ποντικών) συγκρίθηκε με μια άλλη ανάλυση αντισωμάτων με μέθοδο 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 6 και 7 στο τέλος αυτού του εντύπου.

Οι οροί που ελήφθησαν από 96 φυσιολογικά άτομα, 21 ασθενείς με ΣΕΛ, 17 ασθενείς με σκληροδερμία και 20 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα εξετάστηκαν με το κιτ ανάλυσης για αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) (τομές ήπατος ποντικού) και άλλα κιτ ANA που διατίθενται στο εμπόριο. Οι οροί εξετάστηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία και την αραιώση διαλογής που προτείνεται από τον κατασκευαστή. Αυτοί έδωσαν συγκρίσιμα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 8.



## ANÁLISIS PARA DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS

### IVD PROSPECTO

**REF** 1100 Substrato del hígado del ratón 48 análisis

**REF** 1107 Substrato de riñón y estómago de ratón COMVI 48 análisis

**REF** 1136 Substrato de riñón, estómago e hígado de ratón COMVI-III 48 análisis

**REF** 1136-96 Substrato de riñón, estómago e hígado de ratón COMVI-III 96 análisis

### USO PREVISTO

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IF) para la detección y cuantificación de anticuerpos antinucleares (ANA) **REF** 1100, 1107, 1136, 1136-96, anti-mitocondriales (AMA), anti-músculo liso (ASMA), anti-células parietales gástricas (AGPA) **REF** 1107, 1136, 1136-96

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La detección de **anticuerpos antinucleares (ANA)** mediante inmunofluorescencia indirecta ayuda en el diagnóstico de patologías del tejido conectivo, entre ellas el lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de Sjögren y esclerodermia <sup>1-5</sup>. 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 primaria <sup>6-8</sup>.

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 para el diagnóstico diferencial <sup>6-12</sup>.

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

Los **anticuerpos anti-células parietales gástricas (AGPA)** se asocian normalmente a la anemia perniciosa y la gastritis crónica atrófica, 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 perniciosa <sup>15-17</sup>.

### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

En la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizada en este kit, el suero del paciente se incuba en cortes de riñón y estómago de ratón, o bien cortes de riñón, estómago e hígado de ratón, para la unión de los anticuerpos con el tejido de sustrato. Los anticuerpos que no hayan reaccionado se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos de clase IgG se detectan incubando el sustrato con conjugado marcado con fluoresceína. La reacción se observa con un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados. La presencia de ANA, ASMA, AMA, AGPA 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 seriadas<sup>18</sup>.

### DATOS DEL PRODUCTO

#### Conservación y preparación

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

ES

### Material suministrado

Substrato del hígado del ratón **REF** 1100

Substrato de riñón y estómago de ratón COMVI **REF** 1107

Substrato de riñón estómago e hígado de ratón COMVI-III **REF** 1136

Substrato de riñón estómago e hígado de ratón COMVI-III **REF** 1136-96

Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 48 análisis.

6 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>8</b>	Portas de substrato, 8 pocillos <b>REF</b> (1100, 1107, 1136)
12 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>8</b>	Portas de substrato, 8 pocillos <b>REF</b> (1136-96)
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>ANA</b> *	Control positivo a ANA. Contiene suero humano.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>AMA</b> *	Control positivo a AMA. Contiene suero humano
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>-</b> *	Control negativo. Contiene suero humano.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> * †	Conjugado de IgG antihumano con FITC. Protéjase de la luz. (1136-96 2x5ml)
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> <b>EB</b> *	Conjugado de IgG antihumano con FITC. Contiene contraste azul de Evans. Protéjase de la luz. (1136-96EB 2x5ml)
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	Diluyente tamponado
2 viales	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	Tampón fosfato salino (PBS). Disolver cada vial hasta 1 litro.
1 x 5,0 ml	<b>MOUNTING</b> <b>MEDIUM</b> *	Medio de montaje. No congelar.
1 x 1.0 ml	<b>EVANS</b>	Contraste azul de Evans.
1 x 12	<b>COVER</b> <b>SLD</b>	Cubreobjetos

\* Contiene < 0.1% NaN<sub>3</sub>


† kits con un "x" después del número de parte contenga este componente en lugar de IgG-CONJ FITC EB


### Símbolos empleados en las etiquetas:

**LOT** Número de lote

**REF** Número de catálogo

 Fecha de caducidad

 Temperatura de conservación

 Léanse las instrucciones de uso

**IVD** Para diagnóstico *in vitro*



Fabricante



Número de análisis

**Material necesario no incluido**

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

**ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Todo material de origen humano usado en la preparación de este producto se ha examinado con métodos aprobados por la FDA, y resultó negativo a anticuerpos contra HIV, HbsAg y HCV. Las muestras de suero humano y los productos de origen humana deben considerarse potencialmente peligrosos independientemente de su origen. Respétense las buenas prácticas de laboratorio al conservar, dispensar y eliminar tales materiales<sup>19</sup>.

**ATENCIÓN:** la azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) 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 Inc. No los utilice después de la fecha de caducidad.

**RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

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

**PROCEDIMIENTO****Metodología del análisis****A. Control**

1. Diluya el suero del paciente en proporción 1:10 (1107, 1136, 1136-96) con el diluyente tamponado (20 µl de suero + 180 µl diluyente) o 1:20 (código 1100) (10 µl de suero + 190 µl diluyente). No diluya los controles positivo o negativo. Conserve el suero no diluido para determinar la titulación de anticuerpos si los análisis resultaran positivos.
2. Espere a que las bolsas con los portas de substrato se estabilicen a la temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraiga los portas cuidadosamente sin tocar el substrato.
3. Etiquete los portas y colóquelos en la cámara de incubación acondicionada con toallas de papel humedecidas para mantener las condiciones de humedad adecuadas.

ES

4. Invierta el frasco gotero y aplique suavemente 1 gota (aproximadamente 50 µl) de Control negativo en el pocillo #1. Del mismo modo, aplique 1 gota de ANA Control positivo en el pocillo #2. Si procede, 1 gota de AMA Control positivo en el pocillo #3 (1107, 1136, 1136-96). 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 los portas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Retire un porta de la cámara de incubación. Sosteniéndolo por un extremo, lávelo delicadamente con una pipeta y aproximadamente 10 ml de PBS, o bien en un recipiente lleno de PBS. No utilice frasco de lavado. Transfiera de inmediato el porta a una cubeta de Coplin y lávelo durante 10 minutos. Repita el procedimiento con los restantes portas.
8. Retire los portas de la cubeta de Coplin. Seque el borde de los portas con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Ponga 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 porta.
10. Coloque la tapa en la cámara de incubación. Incube 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Extraiga un porta del incubador. Sosteniéndolo por un extremo, sumérgalo en un recipiente con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Ponga los portas en una cubeta de coloración llena de PBS durante 10 minutos. Si está utilizando conjugado sin contraste (véase Componentes opcionales en el apartado Materiales suministrados) puede añadir 2-3 gotas de contraste azul de Evans al lavado final. Repita el procedimiento en los portas restantes. NOTA: un lavado inadecuado podría aumentar la fluorescencia de fondo.
12. Retire un porta de la cubeta de coloración. Seque el borde con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. **Para evitar que el porta se seque, pase de inmediato a la fase sucesiva mientras el porta todavía está húmedo.**
13. Monte el cubre aplicando uniformemente en el mismo **3 gotas** de medio de montaje; ponga el cubre sobre el porta sin presionar demasiado y evitando que se desplace lateralmente.
14. Repita los pasos 12 y 13 para cada porta.
15. Examine la fluorescencia específica con microscopio de fluorescencia con aumento de 200x o más.

Los portas se han de leer tan pronto como estén listos. 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. Los portas deben conservarse en la oscuridad a una temperatura entre 2 y 8°C.

#### **B. Determinación de punto final (titulación)**

Un suero que resulte positivo en la fase de control puede ser analizado nuevamente siguiendo los pasos de 5 a 13 para determinar el título. Cada ciclo de análisis incluirá los controles Positivo y Negativo. Prepare diluciones en serie y por duplicado a partir de 1:10 (código: 1107, 1136, 1136-96) or 1:40 (código: 1100) El recíproco de la mayor dilución que provoca una reacción positiva es la titulación.

#### **Preparación de diluciones en serie**

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:

<b>Tubos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Suero</b>	0.1 ml +					
<b>Diluyente tamponado</b>	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
<b>Transferir</b>	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	
<b>Dilución final</b>	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 fluorescencia específica. 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 y del hígado 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.
- El porta se secó durante el proceso.

### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de los análisis de anticuerpos ANA, AMA, ASMA, AGPA deben considerarse negativos (< 10)

En las secciones del estómago del riñón (código: 1107, 1136, 1136-96) negativas (< 20) en las secciones del hígado (código: 1100) o alternativamente positivo con título.

Lea únicamente los campos que contienen coloración específica del núcleo para ANA, de los túbulos del riñón para AMA, las paredes de los vasos sanguíneos para ASMA, 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.

<b>Homogénea:</b>	Todo el núcleo adquiere fluorescencia homogénea con patrón de tinción difusa.
<b>Membranoso nuclear:</b>	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.
<b>Moteada:</b>	Manchas discretas, de pequeñas a grandes, adquieren fluorescencia en todo el núcleo.
<b>Nucleolar:</b>	Tinción de los nucleolos con motas grandes y gruesas en el núcleo.

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.

ES

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.

### **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.

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 positivo<sup>1</sup>. Es más, el suero de pacientes con afecciones malignas y enfermedades infecciosas puede resultar positivo a ANA.

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 1, 2, 3, 4 y 5 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 ImmuGlo™ de detección de autoanticuerpos (cortes de riñón/estómago de ratón) se comparó con otro ensayo fluorescente disponible en comercio que utiliza como sustrato riñón y estómago de ratón. Para la comparación se utilizaron 20 muestras de suero positivo a ANA, 19 muestras de suero positivo a AMA, 19 de suero positivo a ASMA, 20 de suero positivo a AGPA y 38 de suero de individuos normales. El suero se analizó a partir de una dilución de 1:10 siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. Los resultados obtenidos se resumen y comparan en las tablas 6 y 7 al final de este documento.

El suero de 96 individuos sanos, de 21 pacientes con LES, de 17 pacientes con esclerodermia y de 20 con artritis reumatoide se analizó con el kit de detección de anticuerpos antinucleares (ANA) (cortes de hígado de ratón) y con otros kits ANA disponibles en comercio. El suero se analizó siguiendo el procedimiento y la dilución de control indicados por el fabricante. Los resultados obtenidos se comparan en la tabla 8.



**IMMCO**  
DIAGNOSTICS

# TESTSYSTEM FÜR AUTOANTIKÖRPER

IVD

## BEIPACKTEXT

**REF** 1100 Mäuselebersubstrat 48 Bestimmungen

**REF** 1107 Mausniere-/magen-Substrat COMVI 48 Bestimmungen

**REF** 1136 Mausniere-/magen-/leber-Substrat COMVI-III 48 Bestimmungen

**REF** 1136-96 Mausniere-/magen-/leber-Substrat COMVI-III 96 Bestimmungen

## VERWENDUNGSZWECK

Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest (IF) für den Nachweis und die Quantifizierung von antinukleären Antikörpern (ANA), **REF** 1100, 1107, 1136, 1136-96, antimitochondrialen Antikörpern (AMA), Antikörpern gegen glatte Muskulatur (ASMA), Antikörpern gegen Magenparietalzellen (AGPA), **REF** 1107, 1136, 1136-96.

## 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 zählen<sup>1-5</sup>. 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 Zirrhose<sup>6-8</sup>.

**Antimitochondriale Antikörper (AMA)** treten in über 90% der Fälle von primärer biliärer Zirrhose und bei 3-11% der Patienten mit chronischer aktiver Hepatitis auf; bei Patienten mit extrahepatischer Gallengangsobstruktion und anderen Lebererkrankungen sind sie nicht vorhanden. Aufgrund des durchgängigen Vorhandenseins von antimitochondrialen Antikörpern bei primärer biliärer Zirrhose und ihres faktischen Nichtvorhandenseins bei extrahepatischem Ikterus ist ihr Nachweis von erheblichem Wert für die Differenzialdiagnose<sup>6-12</sup>.

**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<sup>13,14</sup>.

**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 Anämie<sup>15-17</sup>.

## TESTPRINZIP

Bei der in diesen Kits verwendeten indirekten Immunfluoreszenzmethode werden Patientenserum auf Schnitten von Mäusenieren-/magen oder Mäusenieren-/magen-/leber inkubiert, um die Bindung der Antikörper an das Gewebesubstrat zu ermöglichen. Nicht gebundene Antikörper werden durch Spülen entfernt. Gebundene Antikörper der Klasse IgG werden durch Inkubieren des Substrats mit Fluorescein-markiertem Konjugat nachgewiesen. Die Reaktionen werden unter einem Fluoreszenzmikroskop mit den entsprechenden Filtern beobachtet. Das Vorliegen von ANA, ASMA, AMA, 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 des Serums bestimmt<sup>18</sup>.

## PRODUKTINFORMATION Lagerung und Zubereitung

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

DE

### Mitgelieferte Materialien

Mäuselebersubstrat **REF** 1100

Mausniere-/magen-Substrat COMVI **REF** 1107

Mausniere-/magen-/leber-Substrat COMVI-III **REF** 1136

Mausniere-/magen-/leber-Substrat COMVI-III **REF** 1136-96

Der Kit enthält ausreichend Reagenzien, um 48 Bestimmungen durchzuführen

6 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>8</b>	Substrat-Objektträger mit 8 Vertiefungen, <b>REF</b> (1100, 1107, 1136)
12 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>8</b>	Substrat-Objektträger mit 8 Vertiefungen, <b>REF</b> (1136-96)
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> + <b>ANA</b> *	ANA-positives Kontrollserum. Enthält Humanserum.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> + <b>AMA</b> *	AMA-positives Kontrollserum. Enthält Humanserum.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> - *	Negatives Kontrollserum. Enthält Humanserum.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> * †	Anti-human-IgG-FITC-Konjugat. Vor Licht schützen. (1136-96 - 2x5ml)
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> <b>EB</b> *	Anti-human-IgG-FITC-Konjugat mit Evans-Blau. Vor Licht schützen. (1136-96EB - 2x5ml)
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	Gepuffertes Verdünnungsmittel.
2 Fläschchen	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS). Jedes Fläschchen auf 1 Liter auffüllen.
1 x 5,0 ml	<b>MOUNTING</b> <b>MEDIUM</b> *	Eindeckmittel. Nicht einfrieren.
1 x 1,0 ml	<b>EVANS</b>	Evans-Blau-Gegenfärbung.
1 x 12	<b>COVER</b> <b>SLD</b>	Deckgläschen

\* Enthält < 0,1% NaN<sub>3</sub>

† Installationssätze mit einem "x" nach der Teilenummer enthalten  
Sie diesen Bestandteil anstatt IgG-CONJ FITC EB

### Auf den Etiketten verwendete Symbole:

**LOT** Chargennummer

**REF** Bestellnummer

 Verwendbar bis

 Lagerungstemperatur

 Gebrauchsanleitung lesen

**IVD** In-vitro-Diagnostikum

DE



Hersteller



Anzahl an Tests

### **Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien**

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

### **WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Alle menschlichen Serumproben und Produkte menschlichen Ursprungs sollten unabhängig von ihrer Herkunft als potentiell gefährlich behandelt werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis<sup>19</sup>.

WARNUNG – Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

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

### **PROBENTNAHME UND -VORBEREITUNG**

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

### **VERFAHREN**

#### **Testmethode**

#### **A. Suchtest**

1. Verdünnen Sie jedes Patientenserum 1:10 (20 µl Serum + 180 µl Verdünner) oder 1:20 (Code 1100) (10 µl serum + 190 µl Verdünner) mit dem mitgelieferten gepufferten 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.

DE

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. (1107, 1136, 1136-96) 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 Farbtintensität 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 (Code: 1107, 1136, 1136-96) or 1:40 (Code: 1100). eine verdoppelnde Verdünnungsreihe her. Der Kehrwert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion hervorruft, entspricht dem Titer.

### Vorbereitung der Verdünnungsreihen

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 Verdünner	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↗	↗	↗	↗	↗
Übertragung		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Endverdünnung	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 usw.

### QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf sollten sowohl das positive als auch das negative Kontrollserum mitverwendet werden. Das negative Kontrollserum sollte keine spezifische Fluoreszenz zeigen. Das AMA-positive Kontrollserum sollte eine Farbintensität der Nierentubuli von 2+ oder höher aufweisen. Das ANA-positive Kontrollserum sollte eine Farbintensität der Nieren- und Lebernuklei 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, AGPA sollten als negativ (< 10) auf Nieremagenabschnitten (Code: 1107, 1136, 1136-96) Negativ (< 20) auf Leberabschnitten (Code: 1100) oder alternativ positiv mit titer.

Lesen Sie nur Felder ab, die eine spezifische Färbung der Nuklei für ANA, der Nierentubuli für AMA, der Blutgefäßwände für ASMA, der Magenparietalzellen für AGPA. Alle anderen Reaktionen sollten als negativ für ANA, AMA, ASMA, und/oder AGPA.

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.

<b>Homogen:</b>	Der gesamte Nukleus fluoresziert gleichmäßig mit einem diffusen Färbemuster.
<b>Kernmembran:</b>	Die Kernmembrane befleckt am intensivsten als fein lineares Muster mit abnehmender befleckender Intensität des Zellkernplasmas zur Mitte des Kernes
<b>Gefleckt (speckled):</b>	Separate, grobe bis feine runde Flecken im gesamten Nukleus.
<b>Nukleolär:</b>	Die Nukleoli werden innerhalb des Nukleus als mehrere feste Körper gefärbt.

DE

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.

### **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.

Ein positives ANA-Ergebnis sollte nicht als allein diagnostisch für SLE angesehen werden. ANA können auch bei Patienten mit anderen Bindegewebserkrankungen auftreten, und bestimmte Arzneimittel, z.B. Procainamid und Hydralazin, können positive ANA-Ergebnisse verursachen<sup>1</sup>. Außerdem können auch Seren von Patienten mit malignen und infektiösen Erkrankungen ANA-positiv sein. Der Arzt sollte bei der Diagnose die Ergebnisse aller positiven indirekten Immunfluoreszenztests zusammen mit den Ergebnissen anderer Labortests und dem klinischen Zustand des Patienten betrachten.

### **ERWARTETE WERTE**

Wie in Tabellen 1, 2, 3, 4 und 5 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 (Mausniere/-magen) wurde mit einem anderen im Handel erhältlichen Fluoreszenzantikörpertest mit Mausniere/-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 6 und 7 am Ende dieses Dokuments zusammengefasst sind.

Seren von 96 normalen Testpersonen, 21 Patienten mit SLE, 17 Patienten mit Sklerodermie und 20 Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden mit dem Testkit für antinukleäre Antikörper (ANA) (Mäuseleberschnitte) und anderen im Handel erhältlichen ANA-Kits getestet. Die Seren wurden entsprechend den von den Herstellern empfohlenen Verfahren und Suchtestverdünnungen untersucht. Sie erbrachten vergleichbare Ergebnisse, die in Tabelle 8 angezeigt sind.



**IMMCO**  
DIAGNOSTICS

# DETECTION DES AUTOANTICORPS

IVD

## ENCART DU PRODUIT

- REF** 1100 Substrat de foie de souris 48 Tests  
**REF** 1107 Substrat Rein/estomac de souris COMVI 48 Tests  
**REF** 1136 Substrat Rein/estomac/foie de souris COMVI-III 48 Tests  
**REF** 1136-96 Substrat Rein/estomac/foie de souris COMVI-III 96 Tests

Test par immunofluorescence indirecte pour la recherche et la détermination quantitative des anticorps antinucléaires (ANA) **REF** 1100, 1107, 1136, 1136-96, anticorps anti-mitochondriaux (AMA), anticorps anti-muscle lisse (ASMA), anticorps anti-cellule pariétale gastrique (AGPA) **REF** 1107, 1136, 1136-96.

## GENERALITES

Les **Anticorps antinucléaires (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 conjonctif<sup>1-5</sup>. 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)<sup>6-8</sup>.

Les **Anticorps anti-mitochondriaux (AMA)** se retrouvent dans plus de 90% de cas de cirroses 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 maladies<sup>6-12</sup>.

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<sup>13,14</sup>.

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 pernicieuse<sup>15-17</sup>.

## PRINCIPE DE LA METHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce kit, les sérums des patients sont incubés sur des substrats rein/estomac ou rein/estomac/foie de souris, ce qui permet la fixation des anticorps avec le substrat tissu. Un rinçage de la lame élimine tous les anticorps non fixés. Une incubation du substrat avec un conjugué anti-IgG humaines, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps de classe IgG fixés. Les réactions sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert pomme des structures histologiques spécifiques du tissu montre la présence d'ANA, ASMA, AMA, AGPA. Les titres du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) sont alors déterminés par dilutions sériques successives<sup>18</sup>.

## 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

### Matériel fourni

Substrat de foie de souris **REF** 1100

Substrat Rein/estomac de souris COMVI **REF** 1107

Substrat Rein/estomac/foie de souris COMVI-III **REF** 1136

Substrat Rein/estomac/foie de souris COMVI-III **REF** 1136-96

Le kit contient les réactifs suffisants pour exécuter 48 tests.

6 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>8</b>	Lames 8 puits <b>REF</b> (1100, 1107, 1136)
12 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>8</b>	Lames 8 puits <b>REF</b> (1136-96)
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>ANA</b> *	Contrôle positif ANA, avec sérum humain.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>AMA</b> *	Contrôle positif AMA, avec sérum humain.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>-</b> *	Contrôle négatif, avec sérum humain.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> *†	Conjugué FITC anti-IgG humaines. Maintenir à l'abri de la lumière. (1136-96 - 2x5ml)
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> <b>EB</b> *	Conjugué FITC anti-IgG humaines avec coloration Bleu d'Evans. Maintenir à l'abri de la lumière. (1136-96EB - 2x5ml)
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	Diluant sérum.
2 flacons	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	Tampon phosphate salin (PBS). Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre.
1 x 5,0 ml	<b>MOUNTING</b> <b>MEDIUM</b> *	Milieu de montage. Ne pas congeler.
1 x 1.0 ml	<b>EVANS</b>	Contre-coloration Bleu d'Evans.
1 x 12	<b>COVER</b> <b>SLD</b>	Lamelles couvre-lames.

\* Contient < 0.1% NaN<sub>3</sub>


† kits avec un " ; x" ; après le numéro de la pièce contenez ce composant au lieu de IgG-CONJ FITC EB

### Symboles utilisés sur les étiquettes:

**LOT** Numéro de lot

**REF** Numéro de référence catalogue

 A utiliser avant

 Température de conservation

 Lire les instructions d'utilisation

**IVD** Pour usage diagnostique In vitro

 Fabricant

 Nombre de tests

### Matériel nécessaire mais non fourni

- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur

FR

- Pipettes sérologiques
- Bac à coloration pour le lavage des lames (bac 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 PRECAUTIONS**

Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage<sup>19</sup>.

ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ). 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.

### **PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS**

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. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

### **MODE OPERATOIRE**

#### **A. Dépistage**

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:10 (1107, 1136, 1136-96) à l'aide du diluant échantillon fourni (20µl de sérum + 180µl de diluant) ou 1:20 (code n°100) (10 µl de sérum + 190 µl 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.
2. Laisser les lames prendre la température du laboratoire pendant 10-15 minutes dans le sachet scellé. Sortir les lames avec précaution sans toucher le substrat
3. Numéroter les lames et les placer dans la chambre humidifiée avec des serviettes en papier mouillées pour éviter le dessèchement.
4. Retourner le flacon doseur et appuyer doucement pour déposer 1 goutte (environ 50µl) de Contrôle Négatif sur le puit n°1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif ANA sur le puit n°2. Si cela est nécessaire, 1 goutte de contrôle positif AMA sur le puit n°3 (1107, 1136, 1136-96). 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.

FR

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 puit.
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 conjugué sans contre-coloration est utilisé (voir composé en option dans la Section Matériel Fourni), 2-3 gouttes de contre-coloration bleue d'Evans peuvent être ajoutée au lavage final. Répéter les opérations avec toutes les lames.  
REMARQUE: Un lavage incorrect peut augmenter le bruit de fond de fluorescence.
12. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est encore humide.
13. Déposer doucement 3 **gouttes** de milieu de montage dans chaque puit 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 (Code: 1107, 1136, 1136-96) ou 1:40 (Code:1100). Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

### Préparation des dilutions en série

Numéroter six tubes de 1 à 6. Ajouter 0,9 ml de diluant échantillon 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 agiter soigneusement. Transférer 0.2 ml du tube 1 dans le tube suivant. Continuer à transférer 0.2 ml d'un tube à l'autre en mélangeant bien chaque tube pour arriver aux dilutions suivantes :

<b>Tubes</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Sérum</b>	0,1 ml					
	+					
<b>Diluant Echantillon</b>	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		↻	↻	↻	↻	↻
<b>Transfert</b>	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	
<b>Dilution finale</b>	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 etc.

## CONTROLE DE QUALITE

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

FR

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

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

### INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats des essais pour la recherche des anticorps des ANA, des AMA, des ASMA, AGPA doivent être considérés négatifs (< 10) Sur des sections d'estomac de rein (code : 1107, 1136, 1136-96) négatifs (< ; 20) sur des sections de foie (code : 1100) ou alternativement positif avec le titre.

Ne considérer que les champs comprenant une coloration spécifique des noyaux pour les ANA, des tubules de rein pour les AMA, des parois des vaisseaux sanguins pour les ASMA, des cellules pariétales gastriques pour les AGPA. Toutes les autres réactions doivent être considérées négatives pour les ANA, AMA, ASMA, et/ou AGPA.

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

**Homogène** : Le noyau entier est régulièrement fluorescent avec une conformation de coloration diffuse.

**Membrané nucléaire**: La membrane nucléaire souille le plus intensément en tant que modèle très bien linéaire avec l'intensité de souillure décroissante du nucléoplasme vers le centre du noyau

**Tacheté** : Texture grossière et fines taches rondes se colorent dans tout le noyau.

**En corpuscules** : Les nucléoles se colorent comme de multiples éléments dans le noyau.

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

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

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

### LIMITES D'UTILISATION

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

Parfois la présence de deux ou plus anticorps différents dans le sérum et ayant une réactivité vis-à-vis du même substrat, peut créer des interférences pour la détection en immunofluorescence. Cela peut masquer la détection des ANA ou cacher le titre si l'anticorps qui interfère a un titre plus élevé que celui des ANA. Toutes les réactions aux ANA doivent être signalées. Un test positif aux ANA ne peut être considéré en lui-même un diagnostic de SLE. Ils se retrouvent également chez des patients présentant d'autres désordres des tissus conjonctifs et en

FR

présence de certaines drogues telles la procaïnamide et l'hydralazine<sup>1</sup>. De plus, des patients souffrant de maladies infectieuses ou malignes peuvent également résulter positifs aux ANA. Le clinicien doit interpréter un résultat de recherche par immunofluorescence indirecte positif en association avec les autres résultats de tests de laboratoire et les conditions cliniques du patient pour émettre un diagnostic.

### **VALEURS PREVUES**

Comme présenté dans les tableaux 1, 2, 3, 4 et 5 à la fin de ce document, les tests pour la recherche d'anticorps nucléaires sont employés pour détecter le SLE et certains autres problèmes immunologiques. Les AMA se retrouvent dans plus de 90% des cas de cirrhose biliaire primaire et dans 3 à 11% des cas d'hépatite chronique. Les ASMA se retrouvent dans la majorité des cas d'hépatite active chronique et les AGPA sont généralement associés à l'anémie pernicieuse et à la gastrite atrophique chronique.

### **PERFORMANCES**

Le ImmuGlo™ Autoantibody Kit (rein/estomac de souris) a été comparé à un autre test de détection des anticorps par fluorescence disponible dans le commerce et utilisant le rein/estomac de souris comme substrat. La comparaison comprend : 20 échantillons de sérums positifs ANA, 19 échantillons de sérums positifs AMA, 19 échantillons de sérums positifs ASMA, 20 échantillons de sérums positifs AGPA et 38 échantillons de sérum provenant de sujets normaux. On a commencé l'analyse des sérums à une dilution 1:10 selon les procédés recommandés par le fabricant. Ceux-ci ont donné des résultats comparables récapitulés dans les tableaux 6 et 7 à la fin de ce document.

Des sérums obtenus à partir de 96 sujets normaux, de 21 patients atteints de SLE, de 17 patients présentant une sclérodémie et de 20 patients présentant un rhumatisme articulaire ont été examinés sur le kit de recherche d'anticorps antinucléaires (ANA) (sections de foie de souris) et d'autres kits disponibles dans le commerce. Des sérums ont été testés selon les procédés de test et de dilution recommandés par les fabricants. Ceux-ci ont donné des résultats comparables comme récapitulé dans le tableau 8.



**IMMCO**  
DIAGNOSTICS

## TEST DI RILEVAZIONE DI AUTOANTICORPI IN IMMUNOFLUORESCENZA

IVD

### INSERTO DEL PRODOTTO

**REF** 1100 Substrato del fegato del mouse 48 Determinazioni

**REF** 1107 Substrato Rene/Stomaco di Topo COMVI 48 Determinazioni

**REF** 1136 Substrato Rene/Stomaco/Fegato di Topo COMVI-III 48 Determinazioni

**REF** 1136-96 Substrato Rene/Stomaco/Fegato di Topo COMVI-III 96 Determinazioni

### FINALITA' D'USO

Test di immunofluorescenza indiretta (IF) per la rilevazione e la quantificazione di anticorpi anti-nucleari (ANA) **REF** 1100, 1107, 1136, 1136-96, anticorpi anti-mitocondriali (AMA), anticorpi anti-muscolo liscio (ASMA), anticorpi anti-cellule parietali gastriche (AGPA) **REF** 1107, 1136, 1136-96.

### SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Gli **anticorpi anti-nucleari (ANA)**, individuati con la tecnica di immunofluorescenza indiretta, sono utili nella diagnosi dei disturbi del tessuto connettivo quali il lupus eritematoso sistemico (LES), la malattia mista del tessuto connettivo, la sindrome di Sjögren e la sclerodermia<sup>1-5</sup>. Gli ANA compaiono in circa il 95% dei pazienti affetti da LES e in pazienti con altri disturbi del tessuto connettivo. Gli ANA possono essere riscontrati anche in caso di altre patologie quali l'epatite cronica attiva e la cirrosi biliare primitiva<sup>6-8</sup>.

Gli **anticorpi anti-mitocondriali (AMA)**, sono presenti in circa il 90% dei casi di cirrosi biliare primitiva, nel 3-11% dei pazienti con epatite cronica attiva, mentre sono assenti in pazienti con atresia biliare extraepatica o affetti da altre epatopatie. La presenza universale di anticorpi antimitocondriali in caso di cirrosi biliare primitiva e la virtuale assenza nella colestasi extraepatica, rendono l'identificazione di considerevole valore per la diagnosi differenziale<sup>6-12</sup>.

Gli **anticorpi anti-muscolo liscio (ASMA)** in titoli elevati (>160), compaiono nella maggior parte dei casi di epatite cronica attiva e in titoli intermedi (40-80) nei casi di epatite virale acuta. Occasionalmente, possono essere presenti con epatite biliare primitiva anche in titoli intermedi. La significatività dei titoli di 20-40 è incerta dato che questi valori possono essere riscontrati in individui normali<sup>13,14</sup>.

Gli **anticorpi anti-cellule parietali gastriche (AGPA)** sono comunemente associati con l'anemia perniciosa e la gastrite cronica atrofica, con ricorrenza rispettivamente in circa il 90% e 50% dei casi. Gli AGPA non sono specifici e possono ricorrere con frequenza inferiore in altre patologie. Malgrado gli individui sani possono presentare anticorpi anticellule parietali gastriche, la loro individuazione può riflettere la presenza di gastrite atrofica asintomatica. Esiti negativi della presenza di anticorpi anticellule parietali gastriche forniscono un'evidenza consistente per l'esclusione dell'anemia perniciosa<sup>15-17</sup>.

### PRINCIPI DELLA METODICA

Il metodo di immunofluorescenza indiretta adottato in questo kit prevede che i sieri dei pazienti siano incubati su sezioni di rene/stomaco di topo o su sezioni di rene/stomaco/fegato di topo per consentire il legame degli anticorpi al substrato tissutale. Gli anticorpi non legati sono rimossi mediante lavaggio e quelli legati, di classe IgG sono individuati per incubazione del substrato con coniugato marcato con fluoresceina. Le reazioni si osservano per microscopia in fluorescenza usando filtri idonei. La presenza degli ANA, ASMA, AMA e AGPA si manifesta con una fluorescenza verde mela delle strutture istologiche specifiche presenti nel tessuto. I titoli (il valore reciproco della diluizione maggiore che produce una reazione positiva) sono poi determinati analizzando le diluizioni seriali del siero<sup>18</sup>.

### INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

#### Conservazione e preparazione

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

IT

### Materiali forniti

Substrato del fegato del mouse **REF** 1100

Substrato Rene/Stomaco di Topo COMVI **REF** 1107

Substrato Rene/Stomaco/Fegato di Topo COMVI-III **REF** 1136

Substrato Rene/Stomaco/Fegato di Topo COMVI-III **REF** 1136-96

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 48 determinazioni.

6 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>8</b>	Vetrini da 8 pozzetti, <b>REF</b> (1100, 1107, 1136)
12 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>8</b>	Vetrini da 8 pozzetti, <b>REF</b> (1136-96)
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> + <b>ANA</b> *	Controllo Positivo ANA. Contiene siero umano.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> + <b>AMA</b> *	Controllo Positivo AMA. Contiene siero umano.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> - *	Controllo Negativo. Contiene siero umano.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> * †	Coniugato FITC anti-IgG umane. Proteggere dalla luce. (1136-96 - 2x5ml)
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> <b>EB</b> *	Coniugato FITC anti-IgG umane con Blu di Evans. Proteggere dalla luce. (1136-96EB - 2x5ml)
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	Diluente tamponato.
2 fiale	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). Da ricostituire a 1 litro.
1 x 5,0 ml	<b>MOUNTING</b> <b>MEDIUM</b> *	Liquido di montaggio. Non congelare.
1 x 1.0 ml	<b>EVANS</b>	Colorante di contrasto Blu di Evans.
1 x 12	<b>COVER</b> <b>SLD</b>	Vetrini coprioggetto.

\* Contiene < 0,1% NaN<sub>3</sub>


† corredi con un "x" dopo il numero del pezzo contenga questa componente al posto di IgG-CONJ FITC EB


### Simboli usati sulle etichette:

**LOT** Numero di lotto

**REF** Numero catalogo

 Scadenza

 Temperatura di conservazione

 Leggere le istruzioni per l'uso

**IVD** Uso diagnostico in vitro

 Produttore

 Numero di test
**Materiali necessari ma non forniti**

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

**AVVERTENZE E PRECAUZIONI**

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia i derivati del sangue umano e i campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali<sup>19</sup>.

ATTENZIONE – L'azide sodica ( $\text{NaN}_3$ ) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

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

**RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

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

**PROCEDURA****Metodo del Test A. Screening**

1. Diluire il siero del paziente 1:10 (1107, 1136, 1136-96) con il Diluente Tamponato fornito (20  $\mu\text{l}$  di siero + 180  $\mu\text{l}$  di diluente o 1:20 (codice 1100) (10  $\mu\text{l}$  di siero + 190  $\mu\text{l}$  di). Non diluire i Controlli Positivi o Negativi. Conservare il siero non diluito per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che le buste contenenti i vetrini raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti. Rimuovere con attenzione il vetrino senza venire in contatto con il substrato.
3. Contrassegnare i vetrini e disporli nella camera umida sul cui piano interno saranno state poste delle salviette di carta inumidite con acqua per prevenire l'essiccazione.
4. Applicare 1 goccia (circa 50  $\mu\text{l}$ ) 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 (1107, 1136, 1136-96). Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Usando una micropipetta o pipetta Pasteur, applicare 1 goccia di siero diluito del paziente (circa 50  $\mu\text{l}$ ) 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.

IT

7. Rimuovere il vetrino dalla camera umida, reggerlo per l'estremità e irrorare delicatamente con circa 10 ml di PBS usando una pipetta, oppure sciacquare il vetrino in un recipiente contenente PBS. Non usare flaconi di lavaggio. Trasferire immediatamente il vetrino in una vaschetta Coplin di lavaggio e attendere per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
8. Rimuovere il/i vetrino/i dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. Posizionare il vetrino nella camera umida. Applicare immediatamente 1 goccia (circa 50 µl) di Coniugato in ciascun pozzetto.
9. Ripetere le fasi 7 e 8 per ciascun vetrino.
10. Posizionare il coperchio sulla camera umida e incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
11. Rimuovere il vetrino dalla camera umida, reggerlo per l'estremità e immergerlo in un recipiente contenente PBS per rimuovere il coniugato in eccesso. Lasciare il/i vetrino/i per 10 minuti in una vaschetta Coplin riempita con PBS. Nel caso venga usato un coniugato opzionale, privo di colorante di contrasto (vedere componenti opzionali nella sezione Materiali Forniti), possono essere aggiunte 2-3 gocce di Blu di Evans nel lavaggio finale. Ripetere la procedura per i restanti vetrini. **NOTA:** Un lavaggio inadeguato può causare un aumento nella fluorescenza di fondo.
12. Rimuovere il vetrino dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. **Per prevenire l'essiccazione, procedere immediatamente alla fase successiva mentre il vetrino è ancora umido.**
13. Montare il vetrino coprioggetto applicando **3 gocce** di liquido di montaggio uniformemente sul coprioggetto e posizionarlo sopra il vetrino. Evitare di esercitare una pressione eccessiva e gli spostamenti laterali del vetrino coprioggetto.
14. Ripetere le fasi 12 e 13 per ciascun vetrino.
15. Esaminare la fluorescenza specifica mediante microscopia in fluorescenza con ingrandimento 200x o superiore.

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

## B. Determinazione Endpoint (titolazione)

Un siero positivo al test di screening può essere analizzato ulteriormente ripetendo le fasi da 5 a 13 per determinare il titolo anticorpale. Ogni serie di test deve includere Controlli Positivi e Negativi. Preparare diluizioni seriali doppie a partire da 1:10 (Codice: 1107, 1136, 1136-96) or 1:40 (Codice: 1100). Il reciproco del valore della più alta diluizione eseguita a cui il campione mostra positività è il valore del titolo.

### Preparazione delle Diluizioni Seriali

Numerare 6 provette da 1 a 6. 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. Il Controllo Positivo AMA dovrebbe produrre una colorazione dei tubuli renali con intensità di 2+ o maggiore. Il Controllo Positivo ANA dovrebbe presentare una colorazione dei nuclei renali con intensità di 2+ o maggiore e un pattern prevalentemente omogeneo.

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

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

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dei test per gli anticorpi ANA, AMA, ASMA, e AGPA e LKM dovrebbero essere riportati come negativi (< 10) Sulle sezioni dello stomaco del rene (codice: 1107, 1136, 1136-96) negazioni (< 20) sulle sezioni del fegato (codice: 1100) o alternativa positivi con titolo.

Leggere unicamente, per gli ANA i campi contenenti colorazione specifica dei nuclei, per gli AMA i tubuli renali, per gli ASMA le pareti dei vasi sanguigni, per gli AGPA. Tutte le altre reazioni per ANA, AMA, ASMA e/o AGPA dovrebbero essere riportate come negative.

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

**Omogeneo:** Fluorescenza uniforme dell'intero nucleo con pattern di colorazione diffuso.

**Membranous nucleare:** La membrana nucleare macchia il più intensamente come modello benissimo lineare con l'intensità di macchiatura diminvente del nucleoplasma verso il centro del nucleo.

**Punteggiato:** Fluorescenza a macchie tondeggianti da granulari a finemente granulari nell'intero nucleo.

**Nucleolare:** I nucleoli si colorano come corpi solidi multipli all'interno del nucleo.

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

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

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

## LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

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

IT

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 rilevazione degli ANA o in soppressione del titolo se l'anticorpo interferente ha un titolo più alto di quello degli ANA. Tutte le reazioni degli ANA dovrebbero essere riportate.

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 ANA<sup>1</sup> positivi. Inoltre, anche i sieri di pazienti con tumori maligni e malattie infettive possono risultare positivi agli ANA. Per la formulazione della diagnosi i medici dovrebbero pertanto valutare i risultati positivi dei test di immunofluorescenza indiretta insieme ai risultati di altre analisi di laboratorio e alle condizioni cliniche del paziente.

#### **VALORI ATTESI**

Come si può vedere dalle tabelle 1, 2, 3, 4 e 5 riportate alla fine di questo foglio, 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 attiva e gli AGPA sono comunemente associati con l'anemia perniciosa e la gastrite cronica atrofica.

#### **PERFORMANCE DEL TEST**

Il Test di Rilevazione di Autoanticorpi in Immunofluorescenza ImmuGlo™ (Sezioni di Rene/Stomaco di topo) è stato confrontato con un altro test in fluorescenza disponibile in commercio che usa come substrato rene/stomaco di topo. La comparazione ha incluso: 20 campioni di siero positivi agli ANA, 19 campioni di siero positivi agli AMA, 19 campioni di siero positivi agli ASMA, 20 campioni di siero positivi agli AGPA e 38 campioni di siero da soggetti normali. I sieri sono stati analizzati a partire da una diluizione 1:10 secondo la procedura consigliata dal produttore. I risultati dei test sono riassunti nelle Tabelle 6 e 7 riportate alla fine di questo foglio.

I sieri ottenuti da 96 soggetti normali, da 21 pazienti LES, da 17 pazienti con scleroderma e da 20 pazienti con artrite reumatoide sono stati testati con il kit per gli anticorpi antinucleari (ANA) (sezioni di fegato di topo) ed altri kit ANA disponibili in commercio. I sieri sono stati testati secondo la procedura e le diluizioni di screening consigliate dai produttori. Questi test hanno prodotto i risultati indicati nella Tabella 8.



# SISTEMA DE TESTE AUTO-ANTICORPOS

IVD

## FOLHETO DO PRODUTO

**REF** 1100 *Carcaça do fígado do rato 48 Determinações*

**REF** 1107 *Substrato de Estômago/Rim de Murganho COMVI 48 Determinações*

**REF** 1136 *Substrato de Fígado/Estômago/Rim de Murganho COMVI-III 48 Determinações*

**REF** 1136-96 *Substrato de Fígado/Estômago/Rim de Murganho COMVI-III 96 Determinações*

## APLICAÇÃO

Testes de anticorpos de imunofluorescência indirecta (IF) para a detecção e quantificação de anticorpos anti-nucleares (ANA) **REF** 1100, 1107, 1136, 1136-96, anticorpos anti-mitocondriais (AMA), anticorpos anti-músculo liso (ASMA), anticorpos anti-células parietais gástricas (AGPA) **REF** 1107, 1136, 1136-96.

## RESUMO E EXPLICAÇÃO

**Os Anticorpos anti-nucleares (ANA)**, detectados por imunofluorescência indirecta, auxiliam o diagnóstico das patologias do tecido conjuntivo tais como Lúpus eritematoso sistémico (LES), doença mista do tecido conectivo, síndrome de Sjögren e esclerodermia<sup>1-5</sup>. Os ANA apresentam-se em cerca de 95% dos doentes de LES bem como nos doentes com outras doenças do tecido conjuntivo. Os ANA também se podem apresentar noutras patologias tais como hepatite crónica activa e cirrose biliar primária<sup>6-8</sup>.

Os Anticorpos anti-mitocondriais (AMA) apresentam-se em mais de 90% dos casos de cirrose biliar primária, em 3 a 11% dos doentes de hepatite crónica activa e estão ausentes nos doentes com obstrução biliar extra-hepática e noutras doenças do fígado. A presença universal de anticorpos anti-mitocondriais na cirrose biliar primária e a sua ausência virtual na icterícia extra-hepática torna a sua detecção de valor considerável no diagnóstico diferencial<sup>6-12</sup>.

**Os Anticorpos anti-músculo liso (ASMA)** em título elevado (>160) apresentam-se na maioria dos casos de hepatite crónica activa e em títulos intermédios (40-80) em hepatite viral aguda. Ocasionalmente poderão apresentar-se em casos de cirrose biliar primária nas quais também se encontram em titulações intermédias. A importância dos títulos 20-40 é duvidosa visto que estas titulações podem apresentar-se em indivíduos normais<sup>13,14</sup>.

**Os Anticorpos anti-células parietais gástricas (AGPA)** estão normalmente associados a anemia perniciosa e gastrite crónica atrófica nas quais se apresentam em aproximadamente 90% e 50% dos casos, respectivamente. Todavia, não são específicos da doença visto que se podem apresentar em menor frequência noutras patologias. Embora os indivíduos saudáveis possam apresentar anticorpos das células parietais gástricas, esta presença poderá reflectir uma gastrite atrófica assintomática. A ausência de anticorpos anti-células parietais gástricas, é uma forte evidência para a exclusão de anemia perniciosa<sup>15-17</sup>.

## PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

No método de imunofluorescência indirecto usado nestes kits, o soro dos doentes é incubado em cortes de estômago/rim ou estômago/rim/fígado de murganho para permitir a ligação de anticorpos ao substrato tissular. Quaisquer anticorpos que não se tenham ligado são eliminados por lavagem. Os anticorpos que se ligaram, da classe IgG, são detectados através da incubação do substrato com conjugado marcado com fluoresceína. As reacções são observadas com um microscópio de fluorescência equipado com filtros apropriados. A presença de ANA, ASMA, AMA, AGPA é demonstrada por uma fluorescência verde-maçã de estruturas histológicas específicas no tecido. Os títulos (o recíproco da maior diluição que provocou uma reacção positiva) são então determinados testando diluições em série do soro<sup>18</sup>.

## INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO

### Conservação e preparação

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

PT

### Materiais fornecidos

Carcaça do fígado do rato **REF** 1107

Substrato de Estômago/Rim de Murganho COMVI **REF** 1107

Substrato de Fígado/Estômago/Rim de Murganho COMVI-III **REF** 1136

Substrato de Fígado/Estômago/Rim de Murganho COMVI-III **REF** 1136-96

O kit contém reagentes suficientes para executar 48 determinações.

6 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>8</b>	Lâminas de substrato com 8 poços, <b>REF</b> (1100, 1107, 1136)
12 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>8</b>	Lâminas de substrato com 8 poços, <b>REF</b> (1136-96)
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> + <b>ANA</b> *	Controlo positivo para ANA. Contém soro humano.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> + <b>AMA</b> *	Controlo positivo para AMA. Contém soro humano.
1 x 0,5 ml	<b>CONTROL</b> - *	Controlo negativo. Contém soro humano.
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> * †	Conjugado de IgG anti-humana com FITC. Proteger da luz. (1136-96 - 2x5ml)
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> <b>EB</b> *	Conjugado de IgG anti-humana com FITC contendo azul de Evans. Proteger da luz. (1136-96EB - 2x5ml)
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *	Diluyente tamponado.
2 frascos	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	Tampão fosfato salino (PBS). Dissolver cada frasco em 1 l.
1 x 5,0 ml	<b>MOUNTING</b> <b>MEDIUM</b> *	Meio de montagem. Não congelar.
1 x 1,0 ml	<b>EVANS</b>	Contrastante azul de Evans.
1 x 12	<b>COVER</b> <b>SLD</b>	Lamelas

\* Contém < 0,1% NaN<sub>3</sub>

† jogos com um "x" após a número da peça contenha este componente no lugar de IgG-CONJ FITC EB

### Símbolos utilizados nos rótulos:

**LOT** Número de lote


**REF** Número de catálogo

 Prazo de validade


 Temperatura de armazenamento

 Ler as instruções de utilização

PT

 Utilização em diagnóstico *in vitro*

 Fabricante

 Número de testes

#### **Material necessário mas não fornecido**

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

#### **AVISOS E PRECAUÇÕES**

Para uso em diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados para HbsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I e deram resultado negativo nos testes requeridos pela FDA. Todas as amostras de soro humano e produtos de origem humana devem ser tratados como sendo potencialmente perigosos, independentemente da sua origem. Devem-se respeitar as boas práticas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação destes materiais<sup>19</sup>.

AVISO: A azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação dessas azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director de laboratório ou um Centro Anti-Venenos.

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

#### **COLHEITA DAS AMOSTRAS E PREPARAÇÃO**

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

#### **PROCEDIMENTO**

##### **Método do teste**

##### **A. Despiste**

1. Dilua cada soro do doente a 1:10 (1107, 1136, 1136-96) com o Diluente Tamponado fornecido (20 µl de soro + 180 µl de Diluente) ou 1:20 (código 1100) (10 µl de soro + 190 µl de diluente). Não dilua os Controlos Negativo e Positivo. Conserve o soro não diluído para determinar a titulação de anticorpos, se os testes de controlo forem positivos.
2. Deixe que as bolsas com as lâminas de substrato estabilizem à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. Retire as lâminas com atenção sem tocar no substrato.

PT

3. Rotule as lâminas e coloque-as na câmara de incubação revestida com toalhetes de papel humedecidos com água para evitar a secagem.
4. Inverta o frasco conta-gotas e aperte delicadamente para aplicar 1 gota de Controlo Positivo ANA no poço n.º 2. Se aplicável, deite 1 gota de Controlo Positivo AMA no poço n.º 3 (1107, 1136, 1136-96). Evite encher demasiado os poços.
5. Com uma micropipeta ou pipeta de Pasteur, deite 1 gota do soro diluído do doente (cerca de 50 µl) nos outros poços. Evite encher demasiado os poços.
6. Coloque a tampa na câmara de incubação e incube as lâminas 30 minutos à temperatura ambiente.
7. Retire a lâmina da câmara de incubação. Segure na lâmina pela extremidade e lave com cerca de 10 ml de PBS usando uma pipeta, ou lave a lâmina numa proveta com PBS. Não use o frasco de lavagem. Transfira imediatamente a lâmina para o recipiente de Coplin e lave 10 minutos. Repita a operação em todas as lâminas restantes.
8. Retire a(s) lâmina(s) do recipiente de Coplin. Passe o bordo da lâmina num toalhete de papel para eliminar o excesso de PBS. Coloque a lâmina na câmara de incubação. Inverta imediatamente o frasco conta-gotas de Conjugado e aperte ligeiramente para deitar 1 gota (aproximadamente 50 µl) em cada poço.
9. Repita os passos 7 e 8 em cada lâmina.
10. Coloque a tampa na câmara de incubação. Incube por 30 minutos à temperatura ambiente.
11. Retire uma lâmina da câmara de incubação. Segure na lâmina numa ponta e mergulhe-a num recipiente com PBS para eliminar o excesso de conjugado. Coloque a(s) lâmina(s) num recipiente de coloração com PBS durante 10 minutos. Se optar por usar conjugado sem contrastante (consultar componentes opcionais na secção Materiais fornecidos), poderá adicionar 2 a 3 gotas de contrastante azul de Evans à lavagem final. Repita a operação nas lâminas restantes. NOTA: Uma lavagem incorrecta pode levar a um aumento da fluorescência de fundo.
12. Retire a lâmina do recipiente de coloração. Passe o bordo da lâmina num toalhete de papel para eliminar o excesso de PBS. **Para evitar que a lâmina seque, salte imediatamente ao passo seguinte enquanto a lâmina ainda está húmida.**
13. Monte a lamela aplicando **3 gotas** de Meio de Montagem uniformemente na lamela e coloque-a sobre a lâmina. Não faça muita pressão e evite o deslizamento lateral da lamela.
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 intensidade de coloração, se a leitura for adiada até 48 horas. As lâminas devem ser conservadas às escuras entre 2 e 8 °C.

#### **B. Determinação final (titulação)**

Um soro positivo no teste de controlo pode ainda ser mais testado seguindo os passos 5 ao 13 para determinar a titulação. Cada teste deve incluir os Controlos Positivo e Negativo. Efectuar diluições seriais em duplicado partindo de 1:10 (código: 1107, 1136, 1136-96) ou 1:40 (código: 1100). O recíproco da maior diluição que provocou uma reacção será a titulação.

#### **Preparação de diluições em série**

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

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

### CONTROLO DE QUALIDADE

Os Controlos Positivo e Negativo devem ser incluídos em cada teste. O controlo negativo não deve exibir fluorescência específica. O Controlo Positivo AMA deverá ter uma intensidade de coloração 2+ ou superior dos túbulos do rim. O Controlo Positivo ANA deverá ter uma intensidade de coloração 2+ ou superior dos núcleos do rim e do fígado com um padrão homogéneo predominante.

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

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

### INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados dos testes de anticorpos ANA, AMA, ASMA, AGPA deverão ser registados como negativos (< 40) Em seções do estômago do rim (código: 1107, 1136, 1136-96) negativos (< 20) em seções do fígado (código: 1100) ou alternativa positivo com titer.

Leia apenas os campos que contenham coloração específica dos núcleos para ANA, dos túbulos renais para AMA, das paredes dos vasos sanguíneos para ASMA, apenas das células parietais gástricas para AGPA. Todas as outras reacções devem ser apresentadas como negativas para ANA, AMA, ASMA e/ou AGPA.

Os ANA podem ser detectados em todos os substratos mas devem ser quantificados no rim ou nas células HEp-2. Os padrões de coloração nuclear que se podem observar no substrato de rim ou nas células HEp-2 fornecidas incluem homogéneo, periférico (margem), mosqueado e nucleolar. O padrão de coloração dos centrómeros (incluindo as figuras mitóticas) é muito facilmente observado nas células HEp-2. Estes padrões de coloração nuclear estão abaixo descritos. Esses poderão ser unitários ou uma combinação de diversos padrões de coloração. Os últimos são devidos a reacções a numerosos antigénios nucleares diferentes.

**Homogéneo:** Todo o núcleo apresenta uma fluorescência uniforme 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.

**Mosqueado:** Manchas arredondadas descontínuas, de grosseiras a finas, fluorescentes por todo o núcleo.

**Nucleolar:** Os nucléolos coloram-se como corpos sólidos múltiplos dentro do núcleo.

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

Os AMA podem ser observados nos túbulos distais e proximais do rim com uma coloração mais brilhante dos túbulos distais. Apesar de o citoplasma das células parietais gástricas também se colorir, os AMA devem ser quantificados no rim.

PT

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

### **LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**

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

Nalguns casos, a presença de dois ou mais anticorpos num soro que são reactivos com o mesmo substrato podem provocar uma interferência na sua detecção por imunofluorescência. Esta interferência poderá provocar uma falta de detecção de ANA ou a supressão da sua titulação se o anticorpo de interferência tiver uma titulação superior que as reacções ANA. Todas as reacções ANA devem ser registadas.

Um resultado positivo para ANA não deve ser considerado por si só como sendo diagnóstico de LES. Também poderá ocorrer em doentes com outras doenças do tecido conjuntivo e ser induzido por determinados fármacos como a procainamida e a hidralazina<sup>1</sup>. Além disso, os soros de doentes com tumores malignos e doenças infecciosas também podem ser positivos para ANA. O médico, ao fazer o diagnóstico do doente, deve ter em consideração os resultados positivos nos testes de imunofluorescência indirecta em conjunto com os resultados de outras análises laboratoriais e o quadro clínico do doente.

### **VALORES PREVISTOS**

Como se pode observar nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5, no fim deste documento, os testes de anticorpos nucleares são usados para o despiste de LES e de outras patologias imunológicas. Os AMA apresentam-se em mais de 90% dos casos de cirrose biliar primária e em 3 a 11% dos casos de hepatite crónica. Os ASMA apresentam-se na maioria dos casos de hepatite crónica activa e os AGPA estão normalmente associados a anemia perniciosa e gastrite crónica atrofica.

### **CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO**

O Sistema de Teste para Auto-anticorpos ImmuGlo™ (Secções de Estômago/Rim de Murganho) foi comparado com outro teste de anticorpos fluorescente obtido no comércio usando estômago/rim de murganho como substrato. A comparação incluiu: 20 amostras de soro positivo a ANA, 19 amostras de soro positivo a AMA, 19 amostras de soro positivo a ASMA, 20 amostras de soro positivo a AGPA e 38 amostras de soro de sujeitos normais. Os soros foram testados partindo de uma diluição 1:10 pelo método aconselhado pelo fabricante. Esses resultados comparados obtidos estão resumidos nas Tabelas 6 e 7 no fim deste documento.

Os soros obtidos de 96 sujeitos normais, 21 doentes com LES, 17 doentes com esclerodermia e 20 doentes com artrite reumatóide foram testados com o kit de teste (cortes de fígado de murganho) aos anticorpos anti-nucleares (ANA) e com outros kits ANA obtidos no comércio. Os soros foram testados de acordo com o método e a diluição de despiste recomendada pelos fabricantes. Nestes testes obtiveram-se resultados comparáveis, que são indicados na tabela 8.

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

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

**Table 1. Diagnostic. Significance of Antinuclear Antibodies**

<b>IF Staining Pattern</b>	<b>Nature of Antigen</b>	<b>Associated Disease</b>
Homogeneous	dsDNA/Histories	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
	Scl-70	Scleroderma
Nucleolar	RNAP-I	Scleroderma
	PM-SCL RNA	
Centromere/Kinetochores	inner and outer plates of kinetochores	CREST syndrome

\*Mixed Connective Tissue Disease

**Table 1: Incidence of Antinuclear Antibodies (ANA) Detected by Indirect Immunofluorescence on HEp-2 Cells**

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

**Table 2: Incidence of Antinuclear Antibodies (ANA) Detected by Indirect Immunofluorescence on Mouse Kidney Substrate**

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

**Table 3: 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.<sup>21</sup>; Walker JG, et al.<sup>22</sup> and Paronetto F and Popper H<sup>23</sup>.

**Table 4: 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.<sup>13</sup>

**Table 5. 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 6. Findings in Positive Sera**

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

**Table 7. Findings in Normal Controls**

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

**Table 8. Comparison of Kits Using Tissue Sections or HEp-2 Cells for the Detection of ANA**

<b>Clinical Condition</b>	<b>n</b>	<b>% Positive</b>		
		<b>Immco™ Mouse Liver</b>	<b>Other Mouse Kidney</b>	<b>Other HEp-2</b>
SLE	21	95	95	86
Scleroderma	17	82	88	77
RA	20	25	25	5
Normal Controls	96	0	0	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](mailto:info@immco.com)**

*or your local product distributor*



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

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,  
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299  
[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)