



IMMCO
DIAGNOSTICS

ANA/AMA/ASMA/AGPA/LKM Antibody Test System

IVD

PRODUCT INSERT

REF 1134LKM HEp-2/Mouse Liver/Kidney/Stomach 48 Determinations

REF 1136C Mouse Liver/Kidney/Stomach 48 Determinations

REF 2152-3 Mouse Liver/Kidney/Stomach Slide 8 Wells

REF 2190-LKM HEp-2/Mouse Liver/Kidney/Stomach Slide 8 Wells

INTENDED USE

Indirect immunofluorescence (IF) antibody tests for the detection and quantitation of antinuclear antibodies (ANA), anti-mitochondrial antibodies (AMA), anti-smooth muscle antibodies (ASMA), anti-gastric parietal cell antibodies (AGPA), and anti-liver/kidney/microsomal (LKM) antibodies in human serum.

SUMMARY AND EXPLANATION

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

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

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

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

Anti-liver/kidney/microsomal antibodies (LKM) are microsomal antibodies that exhibit characteristic reaction pattern staining of the cytoplasm of liver and proximal tubules of the kidney tissue. They are found in a group of patients with autoimmune hepatitis^{18,20}. LKM antibodies are primarily of the IgG isotype and can be differentiated by various reaction patterns.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

In the indirect immunofluorescence method used in this kit, patients' sera are incubated on HEp-2/Mouse liver/kidney/stomach sections to allow binding of antibodies to the substrate. Unbound antibodies are removed by rinsing the slide. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of the substrate with a fluorescein-labeled, anti-human IgG conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of ANA, ASMA, AMA, AGPA and LKM antibodies are demonstrated by an apple green fluorescence of specific histologic structures in the substrate. The titers (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) are determined by testing serial dilutions²¹.

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

ImmuGlo™ HEp-2/Mouse Liver/Kidney/Stomach Kit **REF** 1134LKM

ImmuGlo™ Mouse Liver/Kidney/Stomach Kit **REF** 1136C

Kit contains sufficient reagents to perform 48 determinations

6 x	SORB SLD 8	8 well Substrate Slides, HEp-2/Mouse Liver/Kidney/Stomach (1134LKM)
6 x	SORB SLD 8	8 well Substrate Slides, Mouse Liver/Kidney/Stomach (1136C)
1 x 0.5 ml	CONTROL + ANA *	ANA Positive Control. Contains human serum. (1134LKM)
1 x 0.5 ml	CONTROL + AMA *	AMA Positive Control. Contains human serum. (1134LKM, 1136C)
1 x 0.5 ml	CONTROL + LKM	LKM Positive Control. Contains human serum. (1136C)
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Negative Control. Contains human serum.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Anti-human IgG FITC Conjugate. Protect from light
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB *†	Anti-human IgG FITC Conjugate containing Evan's Blue. Protect from light.
1 x 60 ml	BUF *	Buffered Diluent.
2 vials	BUF WASH	Phosphate Buffered Saline (PBS). Dissolve each vial to 1 liter.
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Mounting Medium. Do not freeze.
1 x 1.0 ml	EVANS	Evan's Blue (EB) Counterstain.
1 x 12	COVER SLD LONG	Long Coverslips (1134LKM)
1 x 12	COVER SLD	Coverslips (1136C)

* Contains < 0.1% NaN₃

† Replaces conjugate without counterstain in Code numbers containing "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

Material required but not provided

- Fluorescence microscope

EN

- 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, regardless of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹⁹. **WARNING** - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center. Instructions should be followed exactly as they appear in this insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc.. Do not use beyond expiration date.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

PROCEDURE

Test Method

A. Screening

1. Dilute each patient serum 1:10 with the Buffered Diluent provided (10 µl serum + 90 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 Positive Control to well #2. Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur Pipette, apply 1 drop of patient's diluted serum (approximately 50 µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides 30 minutes at room temperature.
7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately 10 ml PBS using a pipette, or rinse slide in beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash 10 minutes. Repeat process with all remaining slides.
8. Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the

slide in the incubation chamber. Immediately invert the Conjugate dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 μ l) to each well.

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

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

B. Endpoint Determination (titration)

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

Preparation of Serial Dilutions

Number six tubes 1 through 6. Add 0.9 ml of Sample Diluent to tube 1 and 0.2 ml to tubes 2 through 6. Pipette 0.1 ml of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer 0.2 ml from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring 0.2 ml from one tube to the next after mixing to yield the dilutions depicted in the following table:

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

QUALITY CONTROL

Both a Positive and Negative Control should be included with each test run. The Negative Control should show no specific fluorescence. The ANA Positive Control should have 2+ or greater staining intensity of the nuclei of the kidney with a predominantly homogeneous pattern. If expected results are not obtained, the run should be repeated. If inadequate results continue to occur with the controls, these may be due to:

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

INTERPRETATION OF RESULTS

The results of the tests for ANA, AMA, ASMA, AGPA, and anti-LKM antibodies should be reported as negative (with titer less than 10), positive (with titer greater than or equal to 320) or, alternatively, positive with specific endpoint titer. Read only fields which contain specific staining of the nuclei for ANA, the kidney tubules for AMA, the kidney blood vessel walls for ASMA, gastric parietal cells only for AGPA, and liver parenchymal cells and kidney proximal tubules for LKM antibodies. All other reactions should be reported as negative for ANA, AMA, ASMA, AGPA and/or LKM. 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 with decreasing staining intensity of the nucleoplasm towards the center of the nucleus.
- Speckled:** Discrete coarse to fine round speckles fluoresce throughout the nucleus.
- Nucleolar:** The nucleoli stain as multiple solid bodies within the nucleus.
- Centromere:** Large speckles of finite number. Reactive antigen segregates with condensed chromosomes in cells undergoing mitosis.

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.

LKM antibodies exhibit a characteristic granular cytoplasmic staining of the liver parenchymal cells and proximal tubules of the kidney. The reactions on stomach are usually negative.

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 ANA¹. 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 1-7 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. Anti-LKM antibodies are found in a subgroup of patients with idiopathic autoimmune chronic hepatitis^{18,20}. The majority of patients with LKM antibodies

EN

had clinical liver disease. Some LKM antibody patients may have sub-clinical hepatitis or hepatocellular carcinoma. LKM antibodies identify a subgroup of HBsAg-negative chronic active hepatitis in which other autoantibody markers are absent. In addition these patients exhibit low levels of serum IgA. See Table 7.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The ImmuGlo™ Autoantibody Test System was compared with another commercially available fluorescent antibody test using HEp-2 cells as a substrate. The comparison included 15 serum samples from normal subjects as well as sera from patients with the diagnosis of SLE, subacute cutaneous lupus erythematosus, scleroderma or rheumatoid arthritis. Sera were tested according to the procedure and screening dilution recommended by the manufacturer. The results appear in Table 8 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 9.



IMMCO
DIAGNOSTICS

Σύστημα ανάλυσης αντισωμάτων ANA/AMA/ASMA/AGPA/LKM

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1134LKM *Κιτ HEp-2-ήπατος/νεφρού/στομάχου ποντικού 48 Προσδιορισμοί*

REF 1136C *ήπατος/νεφρού/στομάχου ποντικού 48 Προσδιορισμοί*

REF 2152-3 *Αντικειμενοφόρος ήπατος/νεφρού/στομάχου ποντικού/HEp-2 8 Κυμελίδες*

REF 2190-LKM *Αντικειμενοφόρος ήπατος/νεφρού/στομάχου ποντικού 8 Κυμελίδες*

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Αναλύσεις αντισωμάτων έμμεσου ανοσοφθορισμού (IF) για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αντι-πυρηνικών αντισωμάτων (ANA), αντι-μιτοχονδριακών αντισωμάτων (AMA), αντισωμάτων κατά των λείων μυικών ινών (ASMA), αντισωμάτων κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου (AGPA) και μικροσωματικών αντισωμάτων ήπατος/νεφρού (LKM) σε ορό ανθρώπου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Τα **αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)**, που ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό, συμβάλλουν στη διάγνωση διαταραχών του συνδετικού ιστού στις οποίες περιλαμβάνονται ο συστηματικός ερυθρεμάτης λύκος (ΣΕΛ), η μικτή νόσος του συνδετικού ιστού, το σύνδρομο Sjögren και η σκληροδερμία¹⁻⁵. Τα αντισώματα ANA εμφανίζονται περίπου στο 95% των ασθενών με ΣΕΛ, καθώς επίσης και σε ασθενείς με άλλες νόσους του συνδετικού ιστού. ANA ενδέχεται επίσης να εμφανιστούν και σε άλλες διαταραχές, όπως η χρόνια ενεργός ηπατίτιδα και η πρωτοπαθής χολική κίρρωση⁶⁻⁸. Τα **αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA)** εμφανίζονται σε ποσοστό άνω του 90% των περιπτώσεων πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης, στο 3-11% των ασθενών με χρόνια ενεργό ηπατίτιδα, ενώ απουσιάζουν σε ασθενείς με εξωηπατική απόφραξη χοληφόρων και άλλες νόσους του ήπατος. Η καθολική παρουσία αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση και η ουσιαστική απουσία τους στον εξωηπατικό ίκτερο, καθιστά την ανίχνυσή τους ιδιαίτερα πολύτιμη για τη διαφορική διάγνωση.⁶⁻¹² Υψηλό τίτλο **αντισωμάτων κατά των λείων μυικών 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 σημασία των τίτλων 20-40 είναι αμφίβολη, καθώς αυτοί οι τίτλοι ενδέχεται να εμφανιστούν σε φυσιολογικά άτομα.^{13,14}

Τα **αντισώματα κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου (AGPA)** 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 αναιμίας¹⁵⁻¹⁷.

Τα **μικροσωματικά αντισώματα ήπατος/νεφρού (LKM)** είναι μικροσωματικά αντισώματα που εμφανίζουν χαρακτηριστικό πρότυπο αντίδρασης χρώσης του κυτταροπλάσματος στο ήπαρ και των εγγύς σωληναρίων του νεφρικού ιστού. Απαντούν σε μια ομάδα ασθενών με αυτοάνοση ηπατίτιδα^{18,20}. Τα αντισώματα LKM είναι κυρίως του ισότυπου IgG και μπορούν να διαφοροποιηθούν με διάφορα πρότυπα αντίδρασης.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Στη μέθοδο έμμεσου ανοσοφθορισμού που χρησιμοποιείται σε αυτό το κιτ, οι οροί των ασθενών επωάζονται σε ένα συνδυασμό κυττάρων HEp-2 και τομών ήπατος/νεφρού/στομάχου ποντικού, προκειμένου να επιτευχθεί δέσμευση των αντισωμάτων στο υπόστρωμα. Τα μη δεσμευμένα αντισώματα απομακρύνονται με έκπλυση της αντικειμενοφόρου. Τα αντισώματα τάξης IgG που έχουν δεσμευθεί ανιχνεύονται με την επώαση του υποστρώματος με συζευκτικό αντίωμα κατά της ανθρώπινης IgG σηματομένο με φλουορεσκεΐνη. Οι αντιδράσεις παρακολουθούνται με μικροσκοπιο φθορισμού που διαθέτει τα κατάλληλα φίλτρα. Η παρουσία αντισωμάτων ANA, ASMA, AMA, AGPA και LKM διαπιστώνεται με την παρουσία φθορισμού έντονου πράσινου χρώματος, σε συγκεκριμένες ιστολογικές δομές στο υπόστρωμα. Οι τίτλοι (το αντίστροφο της υψηλότερης αραιώσης που έδωσε θετική αντίδραση) καθορίζονται με ανάλυση διαδοχικών αραιώσεων²¹.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ**Φύλαξη και προετοιμασία**

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

Υλικά που παρέχονται

Κιτ ΗΕρ-2-ήπατος/νεφρού/στομάχου ποντικού ImmuGlo™ **REF** 1134LKM
 ήπατος/νεφρού/στομάχου ποντικού ImmuGlo™ **REF** 1136C

Το κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 48 προσδιορισμών

6 x	SORB SLD 8	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος με 8 κυψελίδες, ΗΕρ-2-ήπατος/νεφρού/στομάχου ποντικού (1134LKM)
6 x	SORB SLD 8	Αντικειμενοφόροι υποστρώματος με 8 κυψελίδες, ήπατος/νεφρού/στομάχου ποντικού (1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL + ANA *	Διάλυμα θετικού ελέγχου για ANA. Περιέχει ορό ανθρώπου. (1134LKM)
1 x 0,5 ml	CONTROL + AMA *	Διάλυμα θετικού ελέγχου για AMA. Περιέχει ορό ανθρώπου. (1134LKM, 1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL + LKM	Διάλυμα θετικού ελέγχου για LKM. Περιέχει ορό ανθρώπου. (1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης IgG συζευγμένο με FITC. Να προστατεύεται από το φως.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB * †	Συζευκτικό αντίσωμα FITC κατά της ανθρώπινης IgG με χρωστική Evans Blue. Να προστατεύεται από το φως.
1 x 60 ml	BUF *	Αραιωτικό ρυθμιστικό διάλυμα.
2 φιαλίδια	BUF WASH	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Διαλύστε κάθε φιαλίδιο έως όγκο 1 λίτρου.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Μέσο επικάλυψης. Να μην καταψύχεται.
1 x 1,0 ml	EVANS	Επίχρωση Evans blue.
1 x 12	COVER SLD LONG	Καλυπτρίδες μεγάλου μήκους. (1134LKM)
1 x 12	COVER SLD	Καλυπτρίδες (1136C)

* Περιέχει < 0,1% NaN₃

† Αντικαθιστά την κλίση χωρίς counterstain στους κωδικούς αριθμούς που περιέχουν "EB"


Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT Αριθμός παρτίδας

REF Αριθμός καταλόγου

 Ημερομηνία λήξης

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης

EL

 In vitro διαγνωστική χρήση

 Κατασκευαστής

 Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Μικροσκόπιο φθορισμού
- Μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur
- Ορολογικές πιπέτες
- Τρυβλίο χρώσης (π.χ. δοχείο Corlin)
- Μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 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 προϊόντων ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα, ανεξάρτητα από την προέλευσή τους. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έκχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹⁹.

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

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immcο Diagnostics Inc.. Να μη 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 μεγάλου βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση αυτής της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2 - 8°C, 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 με το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης που παρέχεται (10 μl ορού + 90 μl διάλυμα αραιώσης). Μην αραιώνετε τα διαλύματα θετικού ή αρνητικού ελέγχου. Φυλάξτε τους μη αραιωμένους ορούς για να καθορίσετε τους τίτλους αντισωμάτων, εάν οι αναλύσεις διαλογής βρεθούν θετικές.

2. Αφήστε τις θήκες που περιέχουν τις αντικειμενοφόρους του υποστρώματος επί 10-15 λεπτά, προκειμένου να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρέστε προσεκτικά τις αντικειμενοφόρους χωρίς να αγγίξετε το υπόστρωμα.
3. Σημάνετε τις αντικειμενοφόρους και τοποθετήστε τις σε ένα θάλαμο επώασης που έχετε καλύψει με απορροφητικό χαρτί διαβρεγμένο με νερό για να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση.
4. Αναστρέψτε το σταγονόμετρο και πιέστε το ελαφρά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μl) του διαλύματος αρνητικού ελέγχου στην κυψελίδα υπ' αριθμόν 1. Με τον ίδιο τρόπο, προσθέστε 1 σταγόνα διαλύματος θετικού ελέγχου στην κυψελίδα υπ' αριθμόν 2. Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.
5. Χρησιμοποιώντας μια μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur, προσθέστε 1 σταγόνα από τον αραιωμένο ορό του ασθενούς (περίπου 50 μl) στις υπόλοιπες κυψελίδες. Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.
6. Τοποθετήστε το καπάκι στο θάλαμο επώασης και επωάστε τις αντικειμενοφόρους 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 στο 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 εμβαπτίστε την σε ένα ποτήρι ζέσεως με PBS για να αφαιρέσετε την περίσσεια συζευκτικού αντισώματος. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε ένα τρυβλίο 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 αποξήρανση της αντικειμενοφόρου, προχωρήστε αμέσως στο επόμενο βήμα ενώ η αντικειμενοφόρος είναι ακόμη υγρή.**
13. Εφαρμόστε την καλυπτρίδα, προσθέτοντας **3 σταγόνες** μέσου ομοιόμορφα επάνω στην καλυπτρίδα και τοποθετήστε την πάνω στην αντικειμενοφόρο. Αποφύγετε την εφαρμογή άσκοπης πίεσης και αποτρέψτε την πλευρική μετατόπιση 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 (τίτλοδοτηση)

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. Ο τίτλος είναι το αντίστροφο της μεγαλύτερης 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 Τελική αραιώση	0,2 ml 1:10	0,2 ml 1:20	0,2 ml 1:40	0,2 ml 1:80	0,2 ml 1:160	0,2 ml 1:320 κλπ.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Κάθε σειρά ανάλυσης 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 ANA θα πρέπει να παρουσιάζει ένταση φθορισμού των πυρήνων στο νεφρό ίση με 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 διάλυμα ελέγχου και χρησιμοποιήστε ένα άλλο.
- 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 και αντι-LKM θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικά (με τίτλο χαμηλότερο από 10), θετικά (με τίτλο υψηλότερο από ή ίσο με 320) ή εναλλακτικά θετικά με ειδικό τίτλο τελικού σημείου. Διαβάστε μόνο πεδία τα οποία περιλαμβάνουν ειδική χρώση των πυρήνων για τα ANA, των νεφρικών σωληναρίων για τα AMA, των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων του νεφρού για τα ASMA, των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου για τα AGPA και των ηπατικών παρεγχυματικών κυττάρων και των εγγύς σωληναρίων του νεφρού για τα αντισώματα LKM. Όλες οι άλλες αντιδράσεις θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικές για ANA, AMA, ASMA, AGPA και/ή LKM.

Τα αντισώματα ANA μπορούν να ανιχνευθούν σε όλα τα υποστρώματα, αλλά θα πρέπει να ποσοτικοποιούνται στο νεφρό ή στα 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:** Η χρώση της πυρηνικής μεμβράνης είναι πιο έντονη, ενώ η χρώση του πυρηνοπλάσματος μειώνεται σταδιακά προς το κέντρο του πυρήνα.
- Στικτό:** Διακριτικές αδρές έως λεπτές στρογγυλές κηλίδες φθορίζουν σε όλη την έκταση του πυρήνα.
- Πυρηνίσκου:** Οι πυρηνίσκοι χρωματίζονται ως πολλαπλά στερεά σωμάτια εντός του πυρήνα.
- Κεντρομεριδίου:** Πεπερασμένος αριθμός μεγάλων κηλίδων. Το αντιδρών αντιγόνο απομονώνεται μαζί με τα συμπτωκνωμένα χρωμοσώματα στα κύτταρα που βρίσκονται σε μίτωση.

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 Πίνακας 1, στο τέλος αυτού του εντύπου.

EL

Τα AMA μπορούν να παρατηρηθούν τόσο στα άπυ όσο και στα εγγύς νεφρικά σωληνάρια, με εντονότερη τη χρώση στα άπυ σωληνάρια. Παρόλο που χρωματίζεται και το κυτταροπλάσμα 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.

Τα αντισώματα LKM εμφανίζουν μια χαρακτηριστική κοκκιώδη κυτταροπλασματική χρώση των ηπατικών παρεγχυματικών κυττάρων και των εγγύς σωληναρίων του νεφρού. Οι αντιδράσεις είναι συνήθως αρνητικές στο στόμαχο.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οροί θετικοί για ANCA ενδέχεται να εμφανιστούν πολύ ασθενείς ή αρνητικοί στην αρχική αραίωση 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 προκαϊναμίδη και η υδραλαζίνη ενδέχεται να επάγουν ένα θετικό αποτέλεσμα ANA¹. 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 1-7 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.

Τα αντισώματα LKM απαντούν σε ασθενείς με ιδιοπαθή αυτοάνοση χρόνια ηπατίτιδα^{18,20}. Η πλειονότητα των ασθενών με αντισώματα LKM είχαν κλινική ηπατική νόσο. Ορισμένοι ασθενείς με αντισώματα LKM ενδέχεται να πάσχουν από υποκλινική ηπατίτιδα ή από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα αντισώματα LKM αναγνωρίζουν μια υποομάδα HBsAg-αρνητικής χρόνιας ενεργού ηπατίτιδας, στην οποία δεν υπάρχουν άλλοι αυτοαντισωματικοί δείκτες. Επιπλέον, οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα IgA ορού. Βλ. τον Πίνακα 7.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Το σύστημα ανάλυσης αυτοαντισωμάτων ImmuGlo™ συγκρίθηκε με μια άλλη ανάλυση αντισωμάτων με μέθοδο φθορισμού που διατίθεται στο εμπόριο, η οποία χρησιμοποιεί κύτταρα HEp-2 ως υπόστρωμα. Η σύγκριση περιελάμβανε 15 δείγματα ορού από φυσιολογικά άτομα, καθώς και ορούς από ασθενείς με διαγνωσμένο ΣΕΛ, υποξύ δερματικό ερυθηματώδη λύκο, σκληροδερμία ή ρευματοειδή αρθρίτιδα. Οι οροί αναλύθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία και την αραίωση διαλογής που προτείνεται από τον παρασκευαστή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 8 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 αραίωση διαλογής που προτείνεται από τον κατασκευαστή. Αυτοί έδωσαν συγκρίσιμα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 9.



Sistema de detección de anticuerpos ANA/AMA/ASMA/AGPA/LKM

IVD

PROSPECTO

REF 1134LKM Células HEP-2 hígado, riñón y estómago de ratón 48 análisis

REF 1136C Células hígado, riñón y estómago de ratón 48 análisis

REF 2152-3 Portas células hígado, riñón y estómago de ratón 8 pocillos

REF 2190LKM Portas células HEP-2 hígado, riñón y estómago de ratón 8 pocillos

USO PREVISTO

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IF) para la detección y cuantificación de anticuerpos antinucleares (ANA), antimitocondriales (AMA), anti músculo liso (ASMA), *anti células parietales gástricas* (AGPA) y anti microsomales hepáticos y renales (LKM) en suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La detección de anticuerpos antinucleares (ANA) mediante inmunofluorescencia indirecta ayuda en el diagnóstico de enfermedades del tejido conectivo, entre ellas lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad combinada del tejido conectivo, síndrome de Sjögren, esclerodermia y otras patologías del tejido conectivo ¹⁻⁵. Alrededor del 95% de pacientes con LES es ANA positivo, así como pacientes con otras enfermedades del tejido conectivo. Pueden obtenerse resultados positivos para ANA en otras enfermedades tales como hepatitis activa crónica y cirrosis biliar primaria ⁶⁻⁸.

Más del 90% de los casos de cirrosis biliar primaria resultan positivos a los anticuerpos antimitocondriales (AMA), y también del 3 al 11% de los pacientes con hepatitis activa crónica, mientras que no aparecen en pacientes con obstrucción biliar extrahepática y otras enfermedades hepáticas. La presencia universal de anticuerpos antimitocondriales en la cirrosis biliar primaria y su virtual ausencia en la ictericia extrahepática hace que su detección sea de gran valor para el diagnóstico diferencial ⁶⁻¹².

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 ^{13,14}.

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 ¹⁵⁻¹⁷.

Los anticuerpos anti-microsomales hepáticos y renales (LKM) presentan un característico patrón de tinción del citoplasma del hígado y los túbulos proximales del tejido renal. Se encuentran en un grupo de pacientes con hepatitis autoinmune ^{18,20}. Los anticuerpos LKM pertenecen principalmente al isotipo IgG y pueden ser diferenciados mediante varios patrones de reacción.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

En la técnica IF indirecta utilizada en este kit, el suero del paciente se incuba en células HEP-2 / cortes de hígado, riñón y estómago de ratón para la unión de los anticuerpos con el sustrato. Los anticuerpos que no hayan reaccionado se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos de clase IgG se detectan incubando el sustrato con conjugado de IgG antihumana marcada con fluoresceína. La reacción se observa en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados. La presencia de ANA, ASMA, AMA, AGPA y LKM es revelada por una fluorescencia de color verde manzana en estructuras histológicas específicas del sustrato. Los títulos (el recíproco de la mayor dilución que provocó una reacción positiva) se determinan analizando las diluciones seriadas. ²¹.

ES

DATOS DEL PRODUCTO

Conservación y preparación

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

Material suministrado

Células HEp-2 / hígado, riñón y estómago de ratón ImmuLisa™ **REF** 1134LKM

Células / hígado, riñón y estómago de ratón ImmuLisa™ **REF** 1136C

El kit contiene reactivos suficientes para efectuar 48 análisis.

6 x	SORB SLD 8	Portas de sustrato HEp-2/ hígado, riñón y estómago de ratón, 8 pocillos (1134LKM)
6 x	SORB SLD 8	Portas de sustrato / hígado, riñón y estómago de ratón (1136C)
1 x 0.5 ml	CONTROL + ANA *	Control positivo para ANA. Contiene suero humano. (1134LKM)
1 x 0.5 ml	CONTROL + AMA *	Control positivo para AMA. Contiene suero humano (1134LKM, 1136C)
1 x 0.5 ml	CONTROL + LKM	Control positivo para LKM. Contiene suero humano (1136C)
1 x 0.5 ml	CONTROL - *	Control negativo. Contiene suero humano.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Conjugado de IgG antihumana con FITC. Protéjase de la luz.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB *†	Conjugado de IgG antihumana FITC con azul de Evans. Protéjase de la luz.
1 x 60 ml	BUF *	Diluyente tamponado.
2 viales	BUF WASH	Tampón fosfato salino (PBS). Disolver cada vial hasta 1 litro.
1 x 5.0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Medio de montaje. No congelar.
1 x 1.0 ml	EVANS	Contraste azul de Evans
1 x 12	COVER SLD LONG	Cubreobjetos largos
1 x 12	COVER SLD	Cubreobjetos

* Contiene < 0.1% NaN₃


† Sustituye la conjugación sin counterstain en los números de código que contienen el "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

ES

 Para diagnóstico *in vitro*

 Fabricante

 Número de análisis

Material necesario no incluido

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

ADVERTENCIAS

Para uso en diagnóstico *in vitro*. Todo material de origen humano usado en la preparación de este producto se ha examinado con métodos aprobados por la FDA, y resultó negativo a anticuerpos contra 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 materiales¹⁹.

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

Siga estrictamente las instrucciones tal como se presentan en este prospecto para garantizar resultados válidos. No cambie los componentes del kit con otros de otras fuentes o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics 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 con el diluyente tamponado (10 µl de suero + 90 µl de 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.
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 control positivo en el pocillo #2. 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 utiliza 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 producir 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 seriadas y por duplicado a partir de 1:10. El recíproco de la mayor dilución que provoca una reacción positiva es la titulación.

Preparación de diluciones seriadas

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

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

CONTROL DE CALIDAD

En cada ciclo de análisis se deben incluir un control positivo y un control negativo. El control negativo no debe evidenciar fluorescencia específica. El control positivo ANA debe tener una intensidad de coloración del núcleo del riñón de 2+ o superior con un patrón homogéneo predominante.

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

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

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de los análisis de anticuerpos ANA, AMA, ASMA, AGPA y anti-LKM deben registrarse como negativos (título inferior a 10), positivos (título equivalente o superior a 320) o, en alternativa, positivos con título de punto final específico.

Lea únicamente los campos que contienen coloración específica del núcleo para ANA, de los túbulos de riñón para AMA, las paredes de los vasos sanguíneos del riñón para ASMA, las células parietales gástricas únicamente para AGPA, y las células del parénquima hepático y los túbulos proximales del riñón para anticuerpos LKM. Toda otra reacción debe considerarse negativa para ANA, AMA, ASMA, AGPA o LKM. 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.

Homogénea:	Todo el núcleo adquiere fluorescencia homogénea con patrón de tinción difusa.
Membranoso nuclear:	La membrana nuclear tiene coloración más intensa, que va disminuyendo a medida que se acerca al centro del núcleo.
Moteada:	Manchas discretas, de pequeñas a grandes, adquieren fluorescencia en todo el núcleo.
Nucleolar:	Tinción de los nucleolos con motas grandes y gruesas en el núcleo.
Centrómeros:	Motas grandes en cantidad limitada. Los antígenos reactivos se separan con cromosomas condensados en células sometidas a mitosis.

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

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

La tinción del músculo del estómago 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.

Los anticuerpos anti LKM muestran una característica tinción granular del citoplasma de las células del parénquima hepático y los túbulos proximales del riñón. Normalmente, las reacciones en cortes de estómago son negativas.

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 positivo¹. 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 1-7 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. Los anticuerpos anti-LKM están presentes en un subgrupo de pacientes con hepatitis autoinmune crónica idiopática^{18,20}. La mayoría de los pacientes con anticuerpos LKM padece de trastornos hepáticos clínicos. Algunos pacientes positivos a anticuerpos anti-LKM pueden presentar hepatitis subclínica o carcinoma hepatocelular. Los anticuerpos LKM identifican a un subgrupo de hepatitis activa crónica negativa a HBsAg en la que están ausentes otros marcadores de autoanticuerpos. Además, estos pacientes tienen niveles bajos de IgA sérica. Véase la tabla 7.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El sistema de detección de autoanticuerpos ImmuGlo™ se comparó con otro ensayo de detección de anticuerpos por inmunofluorescencia presente en el mercado utilizando como sustrato células HEp-2. Para la comparación se utilizaron 15 muestras de suero de pacientes sanos, así como suero de pacientes con LES diagnosticado, lupus eritematoso cutáneo subagudo, esclerodermia o artritis reumatoide. El suero se analizó siguiendo el procedimiento y la dilución de control indicados por el fabricante. Los resultados se presentan en la tabla 8 al final de este documento.

El suero de 96 individuos normales, 21 pacientes con LES, 17 pacientes con esclerodermia y 20 pacientes con artritis reumatoide se analizó con el método de detección de anticuerpos antinucleares (ANA) (cortes de hígado de ratón) y con otro ensayo ANA disponible en comercio. El suero se analizó siguiendo el procedimiento y la dilución de control indicados por el fabricante. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 9.



Antikörpertestsystem ANA/AMA/ASMA/AGPA/LKM

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1134LKM Hep-2-Mausleber/-niere/-magen-Kit 48 Bestimmungen

REF 1136C Mausleber/-niere/-magen-Kit 48 Bestimmungen

REF 2152-3 Objekträger Maus Leber/Niere/Magen 8 Vertiefungen

REF 2190LKM Objekträger HEp-2/Maus Leber/Niere/Magen 8 Vertiefungen

VERWENDUNGSZWECK

Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest (IF) für den Nachweis und die quantitative Bestimmung von antinukleären Antikörpern (ANA), antimitochondrialen Antikörpern (AMA), Antikörpern gegen glatte Muskulatur (ASMA), Antikörpern gegen Magenparietalzellen (AGPA) und Anti-Leber-Niere-Mikrosomen-Antikörper (LKM) in Humanserum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

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

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

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

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

Anti-Leber-Nieren-Mikrosomen-Antikörper (LKM) sind mikrosomale Antikörper, die ein charakteristisches Färbemuster des Zytoplasmas der Leber und der proximalen Tubuli des Nierengewebes zeigen. Sie sind in einer Patientengruppe mit autoimmuner Hepatitis nachweisbar^{18,20}. LKM-Antikörper sind hauptsächlich vom Isotyp IgG und können durch verschiedene Reaktionsmuster unterschieden werden.

TESTPRINZIP

Bei der in diesem Kit verwendeten indirekten Immunfluoreszenzmethode werden Patientenserum auf einer Kombination aus HEp-2-Zellen und Schnitten von Mäuseleber/-nieren/-magen inkubiert, um die Bindung der Antikörper an das Substrat zu ermöglichen. Nicht gebundene Antikörper werden durch Spülen des Objekträgers entfernt. Gebundene Antikörper der Klasse IgG werden durch Inkubieren des Substrats mit Fluorescein-markiertem Anti-human-IgG-Konjugat nachgewiesen. Die Reaktionen werden unter einem Fluoreszenzmikroskop mit den entsprechenden Filtern beobachtet. Das Vorliegen von ANA, ASMA, AMA, AGPA und LKM 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 bestimmt²¹.

DE

PRODUKTINFORMATION

Lagerung und Zubereitung

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

Mitgelieferte Materialien

ImmuGlo™ Hep-2-Mausleber/-niere/-magen-Kit **REF** 1134LKM

ImmuGlo™ Mausleber/-niere/-magen-Kit **REF** 1136C

Der Kit enthält ausreichend Reagenzien zur Durchführung von 48 Bestimmungen.

6 x	SORB SLD 8	Substrat-Objekträger mit 8 Vertiefungen, Hep-2-Mausleber/-niere/-magen (1134LKM)
6 x	SORB SLD 8	Substrat-Objekträger mit 8 Vertiefungen, Mausleber/-niere/-magen (1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL + ANA *	ANA-positives Kontrollserum. Enthält Humanserum. (1134LKM)
1 x 0,5 ml	CONTROL + AMA *	AMA-positives Kontrollserum. Enthält Humanserum. (1134LKM, 1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL + LKM	LKM-positives Kontrollserum. Enthält Humanserum. (1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Negatives Kontrollserum. Enthält Humanserum.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Anti-human-IgG-FITC-Konjugat. Vor Licht schützen.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB * †	Anti-human-IgG-FITC-Konjugat mit Evans-Blau-Gegenfärbung. Vor Licht schützen.
1 x 60 ml	BUF *	Gepuffertes Verdünnungsmittel.
2 Fläschchen	BUF WASH	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS). Jedes Fläschchen auf 1 Liter auffüllen
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Eindeckmittel. Nicht einfrieren.
1 x 1,0 ml	EVANS	Evans-Blau-Gegenfärbung.
1 x 12	COVER SLD LONG	Langes Deckgläschen (1134LKM)
1 x 12	COVER SLD LONG	Deckgläschen (1136C)

* Enthält <0,1% NaN₃

† Ersetzt Konjugat ohne counterstain in den Kennziffern, die "enthalten; EB"

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

LOT Chargennummer


REF Bestellnummer


 Verwendbar bis


 Lagerungstemperatur

 Gebrauchsanleitung lesen

DE

 In-vitro-Diagnostikum

 Hersteller

 Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

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

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

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

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

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

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

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

VERFAHREN

Testmethode

A. Suchtest

1. Verdünnen Sie jedes Patientenserum 1:10 (10 µl Serum +90 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 positives Kontrollserum in Vertiefung 2. 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 eine verdoppelnde Verdünnungsreihe her. Der Kehrwert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion hervorruft, entspricht dem Titer.

Vorbereitung der Verdünnungsreihen

Nummerieren Sie sechs Röhrchen von 1 bis 6. Geben Sie 0,9 ml Probenverdünner in Röhrchen 1 und je 0,2 ml in Röhrchen 2 bis 6. Pipettieren Sie 0,1 ml unverdünntes Serum in Röhrchen 1 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie 0,2 ml von Röhrchen 1 in Röhrchen 2 und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie nach dem Mischen weiterhin

DE

jeweils 0,2 ml von einem Röhrchen ins nächste, um die in der nachfolgenden Tabelle angezeigten Verdünnungen zu erhalten:

Röhrchen	1	2	3	4	5	6
Serum	0,1 ml					
	+					
Gepufferter Verdüner	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 ANA-positive Kontrollserum sollte eine Farbintensität der Nierennuklei von 2+ oder höher mit einem überwiegend homogenen Muster aufweisen. Falls die erwarteten Ergebnisse nicht erhalten werden, sollte der Testlauf wiederholt werden. Falls mit den Kontrollseren weiterhin unzureichende Ergebnisse erzielt werden, kann dies folgende Ursachen haben:

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

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Tests auf ANA, AMA, ASMA, AGPA und Anti-LKM-Antikörper sollten als negativ (bei einem Titer unter 10), positiv (bei einem Titer von oder über 320) oder alternativ als positiv mit spezifischem Endunkt-Titer angegeben werden. Lesen Sie nur Felder ab, die eine spezifische Färbung der Nuklei für ANA, der Nierentubuli für AMA, der Blutgefäßwände der Nieren für ASMA, der Magenparietalzellen für AGPA und der Leberparenchymzellen und proximalen Nierentubuli für LKM-Antikörper enthalten. Alle anderen Reaktionen sollten als negativ für ANA, AMA, ASMA, AGPA und/oder LKM gemeldet werden.

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

Homogen:	Der gesamte Nukleus fluoresziert gleichmäßig mit einem diffusen Färbemuster.
Kernmembran:	Die nukleäre Membran zeigt die intensivste Färbung, und die Färbeintensität nimmt im Kernplasma zum Mittelpunkt des Nukleus hin ab.
Gefleckt (speckled):	Separate, grobe bis feine runde Flecken im gesamten Nukleus.
Nukleolär:	Die Nukleoli werden innerhalb des Nukleus als mehrere feste Körper gefärbt.
Centromer:	Große Flecken mit begrenzter Anzahl. Reaktives Antigen sondert sich in Zellen, die eine Mitose durchlaufen, mit kondensierten Chromosomen ab.

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

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

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

DE

LKM-Antikörper zeigen eine charakteristische granuläre zytoplasmatische Färbung der Leberparenchymzellen und der proximalen Nierentubuli. Auf Magengewebe sind die Reaktionen normalerweise negativ.

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 verursachen¹. 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 1-7 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.

Anti-LKM-Antikörper werden in einer Untergruppe von Patienten mit idiopathischer autoimmuner chronischer Hepatitis nachgewiesen^{18,20}. Die Mehrzahl der Patienten mit LKM-Antikörpern litt an klinischer Leberkrankheit. Bei einigen Patienten mit LKM-Antikörpern können eine subklinische Hepatitis oder ein hepatozelluläres Karzinom vorliegen. LKM-Antikörper identifizieren eine Untergruppe von HBsAg-negativer chronischer aktiver Hepatitis, in der keine anderen Autoantikörpermarker auftreten. Diese Patienten weisen außerdem niedrige Serum-IgA-Spiegel auf. Siehe Tabelle 7.

LEISTUNGSMERKMALE

Das ImmuGlo™ Autoantikörper-Testsystem wurde mit einem anderen im Handel erhältlichen Fluoreszenz-Antikörpertest, der HEp-2-Zellen als Substrat verwendet, verglichen. Der Vergleich schloss 15 Serumproben von normalen Testpersonen sowie Seren von Patienten mit SLE, subakutem kutanem Lupus erythematodes, Sklerodermie oder rheumatoider Arthritis ein. Die Seren wurden gemäß den vom Hersteller empfohlenen Verfahren und Suchtestverdünnungen getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 am Ende dieses Dokuments angezeigt.

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 9 angezeigt sind.



IMMCO
DIAGNOSTICS

DETECTION DES ANTICORPS ANA/AMA/ASMA/AGPA/LKM

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1134LKM HEp-2-foie/rein/estomac de souris 48 Tests

REF 1136C foie/rein/estomac de souris 48 Tests

REF 2152-3 Lamelle /Foie /Rein/ Estomac de Souris 8 Puits

REF 2190LKM Lamelle Hep-2/Foie /Rein/ Estomac de Souris 8 Puits

Détection par immunofluorescence indirecte pour la recherche et la détermination quantitative des anticorps anti-nucléaires (ANA), anticorps anti-mitochondriaux (AMA), anticorps anti-muscle lisse (ASMA), anticorps anti-cellule pariétale gastrique (AGPA), et anticorps anti-microsomaux foie/rein dans le sérum humain.

GENERALITES

Les **Anticorps anti-nucléaires (ANA)** détectés par immunofluorescence indirecte sont une aide dans le diagnostic des désordres du tissu conjonctif comprenant le lupus érythémateux disséminé (SLE), le Syndrome de Sjögren, la sclérodermie et les diverse maladies du tissu conjonctif¹⁻⁵. Les ANA se retrouvent chez environ 95% de patients atteints de SLE ainsi que chez les patients présentant d'autres maladies du tissu conjonctif. Les ANA peuvent également se retrouver lors d'autres désordres tels que l'hépatite active chronique et la cirrhose biliaire primaire⁶⁻⁸.

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

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

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

Les **anticorps anti-microsomaux foie/rein (LKM)** sont des anticorps microsomaux qui montrent une réaction de conformation de coloration caractéristique du cytoplasme du foie et des tubes proximaux du rein. Ils se retrouvent chez les patients souffrant d'hépatite autoimmunitaire^{18,20}. Les anticorps LKM sont principalement d'isotype IgG et peuvent être différenciés par différentes conformations de réaction.

PRINCIPES DE LA METHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte IF utilisée dans ce kit, les sérums des patients sont incubés sur une combinaison de cellules HEp-2 et de parties de foie/rein/estomac 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 substrat montre la présence d'ANA, ASMA, AMA, AGPA et LKM. Les titres du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) sont alors déterminés par dilutions successives²¹.

INFORMATION PRODUIT

Conservation et préparation des réactifs

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

Matériel fourni

Kit ImmuGlo™ HEp-2-foie/rein/estomac de souris **REF** 1134LKM

Kit ImmuGlo™ foie/rein/estomac de souris **REF** 1136C

Les kits contiennent des réactifs en suffisance pour réaliser 48 tests chacun.

6 x	SORB SLD 8	Lames 8 puits avec substrat de HEp-2-foie/rein/estomac de souris (1134LKM)
6 x	SORB SLD 8	Lames 8 puits avec substrat de foie/rein/estomac de souris (1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL + ANA *	Contrôle positif ANA, contient sérum humain. (1134LKM)
1 x 0,5 ml	CONTROL + AMA *	Contrôle positif AMA, contient sérum humain. (1134LKM, 1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL + LKM	Contrôle positif LKM, contient sérum humain. (1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Contrôle négatif, contient sérum humain.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Conjugué FITC anti-IgG humaines. Maintenir à l'abri de la lumière.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB * †	Conjugué FITC anti-IgG humaines contenant du Bleu d'Evans. Maintenir à l'abri de la lumière
1 x 60 ml	BUF *	Diluant sérum.
2 flacons	BUF WASH	Tampon phosphate salin (PBS). Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Milieu de montage. Ne pas congeler.
1 x 1,0 ml	EVANS	Contre colorant Bleu d'Evans.
1 x 12	COVER SLD LONG	Longue lamelle couvre-lame (1134LKM)
1 x 12	COVER SLD	lamelle couvre-lame (1136C)

* Contient < 0.1% NaN₃


† Remplace le conjugué sans counterstain dans des numéros de code contenant le ";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
- 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'usage¹⁹.

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

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

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 à l'aide du diluant échantillon fourni (10µl de sérum + 90µl 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.

FR

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 sur le puit n°2. Eviter de déborder des puits.
5. A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50µl) de sérum dilué dans les puits restants. Eviter de déborder des puits.
6. Replacer le couvercle sur la chambre et incuber les lames 30 minutes à température ambiante.
7. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette contenant environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un becher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Répéter les opérations avec toutes les lames.
8. Retirer une (les) lame(s) du bac de coloration. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. Déposer la lame dans la chambre d'incubation. Retourner les flacons doseurs de conjugué et déposer immédiatement 1 goutte (environ 50µl) dans chaque 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. 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 :

Tubes	1	2	3	4	5	6
Sérum	0,1 ml					
	+					
Diluant Echantillon	0,9 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
		⇨	⇨	⇨	⇨	⇨
Transfert		0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Dilution finale	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. Le contrôle positif ANA, doit donner une fluorescence 2+ ou supérieure des noyaux du rein avec une conformation principalement homogène.

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

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

INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats des tests pour les ANA, AMA, ASMA, AGPA, et les anticorps anti-LKM doivent être reportés comme négatifs (avec titre inférieur à 10), positifs (avec titre plus grand ou égal à 320) ou, en alternative positifs avec un titre de point de virage spécifique.

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 et des cellules parenchymateuses du foie et du rein pour les LKM. Toutes les autres réactions doivent être considérées négatives pour les ANA, AMA, ASMA, et/ou LKM.

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 se colore plus intensément avec une intensité décroissante du nucléoplasme vers le centre du noyau.
Tacheté :	Texture grossière et fines taches rondes se colorent dans tout le noyau
En corpuscules :	Les nucléoles se colorent comme de multiples éléments dans le noyau.
Centromère :	Grandes taches de nombre déterminé. Les antigènes ayant réagi s'isolent avec les chromosomes condensés des cellules en mitose.

La spécificité de certains des anticorps donnant les conformations de coloration ci-dessus peut être précisée par des essais pour des anticorps au nDNA et pour divers antigènes nucléaires extractibles. Ceci peut être d'une signification clinique comme indiqué dans la Tableau 1 à la fin de ce document. On peut observer les AMA sur les tubes distaux et proximaux du rein, les tubes distaux se 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.

Les anticorps anti-LKM montrent une coloration caractéristique en corpuscules du cytoplasme des cellules parenchymateuses du foie et des tubes proximaux du rein. Les réactions sur l'estomac sont généralement négatives.

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.

FR

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 présence de certaines drogues telles la procainamide et l'hydralazine¹. 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 1-7 à la fin de ce document, les tests de recherche d'anticorps nucléaires sont employés pour détecter le SLE et certains autres désordres 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.

Les anticorps anti-LKM se retrouvent chez un sous-groupe de patients présentant une hépatite chronique idiopathique auto-immune^{18,20}. Les majorités des patients présentant des anticorps anti-LKM présentent des maladies cliniques du foie. Certains patients ayant des anticorps anti-LKM peuvent souffrir d'hépatite sub-clinique ou de cancer primitif du foie. Les anticorps anti-LKM identifient un sous-groupe d'hépatite active chronique négative aux HBsAg dans laquelle les autres anticorps marqueurs sont absents. De plus, ces patients présentent de faibles niveaux de IgA dans le sérum. Voir tableau 7.

PERFORMANCES

Le Immco™ Kit de test anticorps a été comparé à un autre test de détection des anticorps par fluorescence disponible dans le commerce et utilisant les cellules HEp-2 comme substrat. La comparaison comprend 15 échantillons de sérum provenant de sujets normaux ainsi que de patients diagnostiqués pour le SLE, le lupus érythémateux subaigu, la sclérodermie et l'arthrite rhumatoïde. Les sérums ont été testés selon les procédés recommandés par le fabricant. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 8 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 sclérodermie 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 9.



IMMCO
DIAGNOSTICS

TEST IFA per ANTICORPI ANA/AMA/ASMA/AGPA/LKM

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1134LKM Cellule HEp-2 Fegato/Rene/Stomaco di Topo 48 Determinazioni

REF 1136C Cellule Fegato/Rene/Stomaco di Topo 48 Determinazioni

REF 2152-3 Cellule Fegato/Rene/Stomaco di Topo Vetrini da 8 Pozzetti

REF 2190LKM Cellule HEp-2 Fegato/Rene/Stomaco di Topo Vetrini da 8 Pozzetti

FINALITA' D'USO

Test di immunofluorescenza indiretta (IF) per la rilevazione e la quantificazione di anticorpi anti-nucleari (ANA), anticorpi anti-mitocondriali (AMA), anticorpi anti-muscolo liscio (ASMA), anticorpi anti-cellule parietali gastriche (AGPA) e anticorpi anti-microsomiali epato/renali (LKM) nel siero umano.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Gli **anticorpi anti-nucleari (ANA)**, rilevati 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 della sclerodermia¹⁻⁵. Gli ANA compaiono in circa il 95% dei pazienti affetti da LES e in pazienti con altri disturbi del tessuto connettivo. Gli ANA possono essere riscontrati anche in caso di altre patologie quali l'epatite cronica attiva e la cirrosi biliare primitiva⁶⁻⁸.

Gli **anticorpi 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 anti-mitocondriali in caso di cirrosi biliare primitiva e la virtuale assenza nella colestasi extraepatica, rendono l'identificazione di considerevole valore per la diagnosi differenziale⁶⁻¹².

Gli **anticorpi 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^{13,14}.

Gli **anticorpi anti-cellule parietali gastriche (AGPA)** sono comunemente associati con l'anemia perniciosa e la gastrite cronica atrofica, con occorrenza 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 possano 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 perniciosa¹⁵⁻¹⁷.

Gli **anticorpi anti-microsomiali epato/renali (LKM)** sono anticorpi anti-microsomiali che si manifestano con un caratteristico pattern di colorazione del citoplasma del fegato e dei tubuli prossimali del tessuto renale. Si riscontrano in un gruppo di pazienti con epatite autoimmune^{18,20}. Gli anticorpi LKM sono prevalentemente dell'isotipo IgG e sono differenziabili in base ai diversi pattern di reazione.

PRINCIPI DELLA METODICA

Il metodo di immunofluorescenza indiretta adottato in questo kit prevede che i sieri dei pazienti siano incubati su sezioni di fegato/rene/stomaco di topo per consentire il legame degli anticorpi al substrato tissutale. Gli anticorpi non legati sono rimossi mediante lavaggio del vetrino, quelli legati, di classe IgG sono individuati per incubazione del substrato con coniugato anti-IgG umana marcato con fluoresceina. Le reazioni si osservano per microscopia in fluorescenza usando filtri idonei. La presenza degli ANA, ASMA, AMA e AGPA e LKM 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 seriali²¹.

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

Cellule HEp-2 Fegato/Rene/Stomaco di Topo ImmuGlo™ **REF** 1134LKM

Cellule Fegato/Rene/Stomaco di Topo ImmuGlo™ **REF** 1136C

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 48 determinazioni.

6 x	SORB SLD 8	Vetrini da 8 pozzetti, substrato HEp-2 Fegato/Rene/Stomaco di topo. (1134LKM)
6 x	SORB SLD 8	Vetrini da 8 pozzetti, substrato Fegato/Rene/Stomaco (1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL + ANA *	Controllo Positivo ANA. Contiene siero umano. (1134LKM)
1 x 0,5 ml	CONTROL + AMA *	Controllo Positivo AMA. Contiene siero umano. (1134LKM, 1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL + LKM	Controllo Positivo LKM. Contiene siero umano. (1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Controllo Negativo. Contiene siero umano.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Coniugato FITC anti-IgG umane. Proteggere dalla luce.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB * †	Coniugato FITC anti-IgG umane con Blu di Evans. Proteggere dalla luce.
1 x 60 ml	BUF *	Diluyente tamponato.
2 fiale	BUF WASH	Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). Da ricostituire a 1 litro.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Liquido di montaggio. Non congelare.
1 x 1,0 ml	EVANS	Colorante di contrasto Blu di Evans.
1 x 12	COVER SLD LONG	Vetrini coprioggetto lunghi (1134LKM)
1 x 12	COVER SLD	Vetrini coprioggetto (1136C)

* Contiene < 0,1% NaN₃


† Sostituisce il coniugato senza counterstain nei numeri di codice che contengono il "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

IT

- 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 materiali¹⁹. **ATTENZIONE** – L'azide sodica (NaN₃) 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 con il Diluente Tamponato fornito (10 µl di siero + 90 µl di diluente). Non diluire i Controlli Positivi o Negativi. Conservare il siero non diluito per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che le buste contenenti i vetrini raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti. Rimuovere con attenzione il vetrino senza venire in contatto con il substrato.
3. Contrassegnare i vetrini e disporli nella camera umida sul cui piano interno saranno state poste delle salviette di carta inumidite con acqua per prevenire l'essiccazione.
4. Applicare 1 goccia (circa 50 µl) di Controllo Negativo nel pozzetto #1. Allo stesso modo applicare 1 goccia di Controllo Positivo nel pozzetto #2. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Usando una micropipetta o pipetta Pasteur, applicare 1 goccia di siero diluito del paziente (circa 50 µl) negli altri pozzetti. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
6. Posizionare il coperchio sulla camera umida e incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
7. Rimuovere il vetrino dalla camera umida. reggerlo per l'estremità e irrorare delicatamente con circa 10 ml di PBS usando una pipetta, oppure sciacquare il vetrino in un recipiente contenente PBS. Non usare flaconi di lavaggio. Trasferire immediatamente il vetrino in una vaschetta Coplin di lavaggio e attendere per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
8. Rimuovere il/i vetrino/i dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. 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. Riposizionare 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 a 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 a partire da 1:10. Il reciproco del valore della più alta diluizione 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 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, AGPA e LKM dovrebbero essere riportati come negativi con titolo inferiore a 10, positivi con titolo superiore o uguale a 320 o, in alternativa, positivi con titolo endpoint specifico. 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 le cellule parietali gastriche e per gli anticorpi anti-LKM le cellule parenchimali del fegato e i tubuli prossimali dei reni. Tutte le altre reazioni per ANA, AMA, ASMA, AGPA e/o LKM dovrebbero essere riportate come negative. Gli ANA possono essere rilevati su tutti i substrati ma dovrebbero essere quantificati sul rene o su cellule epiteliali HEp-2. Il pattern di colorazione nucleare osservabile con il substrato renale o con le cellule epiteliali HEp-2 può essere di tipo omogeneo, periferico (bordo), punteggiato e nucleolare. Il pattern di colorazione del centromero (incluse le figure mitotiche) è più evidente sulle cellule epiteliali HEp-2. I pattern di colorazione nucleare possibili sono descritti di seguito e possono manifestarsi in una o più combinazioni. come risultato di reazioni a diversi antigeni nucleari.

Omogeneo:	Fluorescenza uniforme dell'intero nucleo con pattern di colorazione diffuso.
Membranous nucleare:	La membrana nucleare si colora con maggiore intensità. Si ha una diminuzione dell'Intensità della colorazione del nucleoplasma verso il centro del nucleo.
Punteggiato:	Fluorescenza a macchie tondeggianti da granulari a finemente granulari nell'intero nucleo.
Nucleolare:	I nucleoli si colorano come corpi solidi multipli all'interno del nucleo.
Centromero:	Macchie larghe di numero finito. L'antigene reattivo è segregato con i cromosomi condensati in cellule in fase mitotica.

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 illustrativo.

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.

Gli anticorpi LKM si manifestano con una caratteristica colorazione granulare citoplasmatica delle cellule parenchimali del fegato e dei tubuli prossimali del rene. Le reazioni su stomaco sono solitamente negative.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

In alcuni casi, i sieri positivi per gli ANA possono essere o molto deboli o negativi alla diluizione iniziale di screening (fenomeno prozona). In questi casi incerti, i sieri dovrebbero essere analizzati a diluizioni maggiori e, se positivi, dovranno essere determinati i titoli anticorpali. Nel caso in cui in un siero siano presenti due o più anticorpi reattivi con lo stesso substrato, può verificarsi un'interferenza nel rilevamento per immunofluorescenza. L'interferenza può risultare in mancata individuazione degli ANA o in soppressione del titolo se l'anticorpo interferente ha un titolo più alto di quello degli ANA. Tutte le reazioni degli ANA dovrebbero essere riportate. 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 positivi¹. 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 1-7 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

IT

e la gastrite cronica atrofica. Gli anticorpi anti-LKM si riscontrano in un sottogruppo di pazienti affetti da epatite cronica idiopatica autoimmune¹⁸⁻²⁰. La maggior parte dei pazienti con anticorpi LKM presenta epatopatia clinica. Alcuni pazienti con anticorpi LKM possono presentare epatite subclinica o carcinoma epatocellulare. Gli anticorpi LKM identificano un sottogruppo di epatite cronica attiva HBsAg-negativa nel quale sono assenti altri marcatori autoanticorpo. Questi pazienti mostrano inoltre livelli bassi di IgA nel siero. Vedere Tabella 7.

Caratteristiche di PERFORMANCE

Il Test di Rilevazione degli Autoanticorpi in Immunofluorescenza ImmuGlo™ è stato confrontato con un altro test in fluorescenza disponibile in commercio che usa come substrato *cellule epiteliali HEp-2*. La comparazione ha incluso 15 campioni di siero prelevati da individui normali e da pazienti con diagnosi di LES, la sclerodermia o artrite reumatoide. I sieri sono stati testati secondo la procedura e le diluizioni di screening consigliate dai produttori. I risultati sono raccolti nella tabella 8 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 secondo la procedura e le diluizioni di screening consigliate dai produttori. Questi test hanno prodotto i risultati indicati nella Tabella 9.



Sistema de teste de anticorpos ANA/AMA/ASMA/AGPA/LKM

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1134LKM Kit de fígado/rim/estômago de murganho HEp-2 48 Determinações

REF 1136C Kit de fígado/rim/estômago de murganho 48 Determinações

REF 2152-3 Lâmina de /Estômago/Rim/Fígado de murganho 8 Poços

REF 2190LKM Lâmina de HEp-2/Estômago/Rim/Fígado de murganho 8 Poços

APLICAÇÃO

Testes de anticorpos por imunofluorescência indirecta (IFI) para detecção e quantificação de anticorpos anti-nucleares (ANA), anticorpos anti-mitocondriais (AMA), anticorpos anti-músculo liso (ASMA), anticorpos anti-células parietais gástricas (AGPA) e anticorpos anti-microsomas do fígado/rim (LKM) em soro humano.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os anticorpos anti-nucleares (ANA) detectados por imunofluorescência indirecta ajudam no diagnóstico de doenças do tecido conjuntivo, incluindo lúpus eritematoso sistémico (LES), doença mista do tecido conjuntivo, síndrome de Sjögren e esclerodermia¹⁻⁵. Os ANA ocorrem em cerca de 95% dos doentes com LES, bem como em doentes com outras doenças do tecido conjuntivo. Podem ainda ocorrer noutras doenças como, por exemplo, hepatite crónica activa e cirrose biliar primária⁶⁻⁸.

Os anticorpos anti-mitocondriais (AMA) ocorrem em mais de 90% dos casos de cirrose biliar primária, 3–11% de doentes com hepatite crónica activa e estão ausentes em doentes com obstrução biliar extra-hepática e noutras doenças hepáticas. A presença universal de anticorpos anti-mitocondriais na cirrose biliar primária e a quase total ausência na icterícia de origem extra-hepática faz com que a sua detecção seja bastante importante no diagnóstico diferencial⁶⁻¹².

Os anticorpos anti-músculo liso (ASMA) ocorrem, em títulos elevados (> 160), na maioria dos casos de hepatite activa crónica e, em títulos intermédios (40-80), na hepatite viral aguda. Por vezes, podem ocorrer, também em títulos intermédios, em casos de cirrose biliar primária. A importância de títulos de 20–40 é duvidosa, uma vez que estes títulos podem ocorrer em indivíduos normais^{13,14}.

Os anticorpos anti-células parietais gástricas (AGPA) estão frequentemente associados a anemia perniciosa e gastrite atrófica crónica, doenças em que ocorrem em cerca de 90% e 50% dos casos, respectivamente. Porém, não são específicos destas doenças, pois podem ocorrer com menor frequência noutras patologias. Apesar de indivíduos saudáveis poderem ter anticorpos anti-células parietais gástricas, este achado pode ser o reflexo de gastrite atrófica assintomática. Resultados negativos para anticorpos anti-células parietais gástricas fornecem sólidas provas para exclusão de anemia perniciosa¹⁵⁻¹⁷.

Os anticorpos anti-microsomas do fígado/rim (LKM) são anticorpos dirigidos contra os microsomas, que apresentam um característico padrão de coloração do citoplasma no fígado e nos túbulos proximais do tecido renal. São encontrados num grupo de doentes com hepatite auto-imune^{18,20}. Os anticorpos LKM pertencem principalmente ao isótipo IgG e podem ser diferenciados por diversos padrões de reacção.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

No método de imunofluorescência indirecta utilizado neste kit, os soros dos doentes são incubados numa combinação de células HEp-2/cortes de rim/estômago/fígado de murganho para permitir a ligação dos anticorpos ao substrato. Os anticorpos não ligados são removidos por lavagem da lâmina. Os anticorpos ligados da classe IgG são detectados por incubação do substrato com conjugado de IgG anti-humana marcada com fluoresceína. As reacções foram observadas sob um microscópio de fluorescência equipado com os filtros adequados. A presença de ANA, ASMA, AMA, AGPA e anticorpos anti-LKM é demonstrada pela presença de fluorescência verde-maçã das estruturas histológicas específicas no tecido. Os títulos (o recíproco da diluição mais elevada de uma determinada reacção positiva) são depois determinados através de testes das diluições seriadas²¹.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO**Conservação e preparação**

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

Materiais fornecidos

Kit de fígado/rim/estômago de murganho HEp-2 ImmuGlo™ **REF** 1134LKM

Kit de fígado/rim/estômago de murganho ImmuGlo™ **REF** 1136C

O kit contém reagentes suficientes para executar 48 determinações.

6 x	SORB SLD 8	Lâminas de substrato com 8 poços, fígado/rim/estômago de murganho HEp-2 (1134LKM)
6 x	SORB SLD 8	Lâminas de substrato com 8 poços, fígado/rim/estômago de murganho (1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL + ANA *	Controlo positivo para ANA. Contém soro humano. (1134LKM)
1 x 0,5 ml	CONTROL + AMA *	Controlo positivo para AMA. Contém soro humano (1134LKM, 1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL + LKM *	Controlo positivo para LKM. Contém soro humano (1136C)
1 x 0,5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo. Contém soro humano.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC *	Conjugado de IgG anti-humana com FITC. Proteger da luz.
1 x 5 ml	IgG-CONJ FITC EB * †	Conjugado de IgG anti-humana com FITC contendo azul de Evans. Proteger da luz.
1 x 60 ml	BUF *	Diluyente tamponado.
2 frascos	BUF WASH	Tampão fosfato salino (PBS). Dissolver cada frasco em 1 l.
1 x 5,0 ml	MOUNTING MEDIUM *	Meio de montagem. Não congelar.
1 x 1,0 ml	EVANS	Contrastante azul de Evans.
1 x 12	COVER SLD LONG	Lamelas compridas (1134LKM)
1 x 12	COVER SLD	Lamelas (1136C)

* Contém < 0,1% NaN₃

† Substitui o conjugado sem o counterstain nos números de código que contêm o " EB"

Símbolos utilizados nos rótulos:

LOT Número de lote

REF Número de catálogo

 Prazo de validade

 Temperatura de armazenamento

 Ler as instruções de utilização

IVD Utilização em diagnóstico in vitro

PT



Fabricante



Número de testes

Materiais necessários mas não fornecidos

- Microscópio de fluorescência
- Micropipeta ou pipeta de Pasteur
- Pipetas serológicas
- Recipiente de coloração (ex., jarra de Coplin)
- Tubos de ensaio pequenos (ex., 13 x 75 mm) e respectivo suporte
- Água destilada ou desionizada
- Recipiente de 1 l
- Frasco de lavagem
- Toalhetes de papel
- Câmara de incubação

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Para diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes obtidos a partir de seres humanos foram testados relativamente à presença de HbsAg, VHC, VIH-1, VIH-2 e HTLV-I, tendo-se obtido resultados negativos em testes exigidos pela FDA. Todas as amostras de soro humano e produtos obtidos em seres humanos devem ser tratadas como potencialmente perigosas, independentemente da sua origem. Siga as boas práticas de laboratório em relação à conservação, distribuição e eliminação destes materiais¹⁹. ADVERTÊNCIA — A azida de sódio (NaN_3) pode reagir com a canalização de cobre e chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Elimine os líquidos com um grande volume de água para impedir a acumulação de azidas. A azida de sódio pode ser tóxica por ingestão. Em caso de ingestão, avise imediatamente o director do laboratório ou o centro anti-venenos. Para garantir resultados válidos deve seguir-se com rigor as instruções descritas neste folheto informativo. Não troque componentes do kit por componentes de outras origens que não tenham o mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Não utilize para além do fim do prazo de validade.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Neste procedimento só devem ser utilizadas amostras de soro. Amostras muito hemolisadas, lipémicas ou com contaminação microbiana podem interferir com o desempenho do teste e não devem ser utilizadas. Conserve as amostras a uma temperatura entre 2 e 8 °C durante um período não superior a uma semana. Para um armazenamento mais prolongado, o soro deve ser congelado a -20 °C. Evite ciclos repetidos de congelação e descongelação das amostras.

PROCEDIMENTO

Método de teste

A Despiste

1. Dilua cada amostra de soro do doente numa proporção de 1:10 com o diluente tamponado fornecido (10 µl de soro + 90 µl de diluente). Não dilua controlos positivos ou negativos. Guarde os soros não diluídos para determinar os títulos de anticorpos se os testes de despiste forem positivos.
2. Deixe ficar as bolsas que contêm as lâminas de substrato à temperatura ambiente durante 10–15 min. Retire as lâminas com cuidado sem tocar no substrato.
3. Identifique as lâminas e coloque-as na câmara de incubação revestida com toalhetes de papel humedecidos com água, com o objectivo de impedir a secagem.
4. Inverta o frasco doseador e aperte suavemente para colocar 1 gota (aproximadamente 50 µl) do controlo negativo ao poço n.º 1. Da mesma forma, coloque 1 gota de controlo positivo no poço n.º 2. Evite encher demasiado os poços.

5. Com uma micropipeta ou uma pipeta de Pasteur, coloque 1 gota de soro do doente diluído (aproximadamente 50 µl) nos outros poços. Evite encher demasiado os poços.
6. Ponha a tampa na câmara de incubação e incube as lâminas durante 30 min à temperatura ambiente.
7. Retire uma lâmina da câmara de incubação. Segure a lâmina pelo lado com etiqueta e use uma pipeta para enxaguar suavemente com aproximadamente 10 ml de PBS ou enxagúe a lâmina numa proveta cheia de PBS. Não utilize o frasco de lavagem. Transfira a lâmina imediatamente para dentro da jarra de Coplin e lave 10 min. Repita o processo com todas as restantes lâminas.
8. Retire a(s) lâmina(s) da jarra de Coplin. Encoste o bordo da lâmina a um toalhete de papel para remover o excesso de PBS. Ponha a lâmina na câmara de incubação. Inverta imediatamente o frasco doseador de conjugado e aperte-o com cuidado para colocar 1 gota (aproximadamente 50 µl) em cada poço.
9. Repita os passos **7 e 8** para cada lâmina.
10. Volte a colocar a tampa da câmara de incubação. Incube 30 min à temperatura ambiente.
11. Retire a lâmina da incubadora. Segure a lâmina pelo lado com etiqueta e mergulhe a lâmina numa proveta contendo PBS, para remover o excesso de conjugado. Ponha a(s) lâmina(s) num recipiente de colocação cheio de PBS durante 10 min. 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 para as restantes lâminas. NOTA: a lavagem inadequada pode produzir um aumento da fluorescência de fundo.
12. Retire uma lâmina do recipiente de coloração. Encoste o bordo da lâmina a um toalhete de papel para remover o excesso de PBS. **Para impedir que a lâmina seque, prossiga imediatamente para o passo seguinte enquanto a lâmina ainda está húmida.**
13. Prepare a montagem da lamela colocando **3 gotas** de meio de montagem uniformemente sobre a lamela e ponha a lamela sobre a lâmina. Evite aplicar sob pressão e previna movimentos laterais da lamela.
14. Repita os passos 12 e 13 para cada lâmina.
15. Com uma ampliação de 200x ou superior, observe as lâminas num microscópio de fluorescência, verificando se existe fluorescência específica.

As lâminas podem ser lidas assim que estiverem preparadas. Contudo, devido à presença de um agente anti-descoloração no meio de montagem, não se observa uma perda significativa da intensidade da coloração se a leitura for atrasada por 48 h. As lâminas devem ser conservadas ao abrigo da luz a uma temperatura entre 2 e 8 °C.

B. Determinação do valor final (titulação)

Um soro positivo no teste de despiste pode ser posteriormente testado seguindo os passos 5 a 13 para determinação do título. Cada execução do teste deve incluir o controlo positivo e o controlo negativo. Faça diluições duplas seriadas começando em 1:10. O título corresponde ao recíproco da diluição mais alta que tenha uma reacção positiva.

Preparação de diluições seriadas

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

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

Controlo de qualidade

Em cada execução do teste deve incluir-se um controlo positivo e um controlo negativo. O controlo negativo não deve exibir fluorescência específica. O controlo positivo ANA deve ter uma intensidade de coloração dos núcleos de células dos túbulos renais igual ou superior a 2+ com um padrão predominantemente homogéneo. Se não forem obtidos os resultados esperados, a execução deve ser repetida. No caso de continuarem a ser obtidos resultados inadequados com os controlos, isto poderá dever-se a:

- Turvação. Rejeite e use outro controlo.
- Problemas com o sistema óptico do microscópio de fluorescência. Podem incluir: alinhamento incorrecto, lâmpada usada para além da vida útil prevista, etc.
- Deixar a lâmina secar durante o procedimento.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados dos testes para anticorpos ANA, AMA, ASMA, AGPA e anti-LKM devem ser apresentados como negativos (com título inferior a 10), positivos (com título igual ou superior a 320) ou, em alternativa, positivos com título de ponto final específico. Leia apenas os campos que contenham coloração específica dos núcleos para ANA, dos túbulos renais para AMA, das paredes dos vasos sanguíneos renais para ASMA, apenas das células parietais gástricas para AGPA, e das células do parênquima hepático e dos túbulos proximais do rim para anticorpos anti-LKM. Todas as outras reacções devem ser apresentadas como negativas para ANA, AMA, ASMA e/ou anti-LKM. Os ANA podem ser detectados em todos os substratos mas devem ser quantificados no rim ou células HEp-2. Os padrões de coloração nuclear que se observam com substrato renal ou células HEp-2 fornecidos incluem homogéneo, periférico (marginal), mosqueado e nucleolar. O padrão de coloração dos centrómeros (incluindo figuras mitóticas) é observado mais facilmente nas células HEp-2. Estes padrões de coloração nuclear são descritos a seguir. Podem ser um só ou uma combinação de vários padrões de coloração. A combinação ocorre devido a várias reacções a diferentes antigénios nucleares.

Homogéneo:	todo o núcleo fica uniformemente fluorescente com um padrão de coloração difuso.
Membranous nuclear:	a membrana nuclear cora mais intensamente e verifica-se uma diminuição da intensidade da colocação do nucleoplasma na direcção do centro do núcleo.
Mosqueado:	fluorescência de manchas com formas variadas, desde grosseira a redonda, por todo o núcleo.
Nucleolar:	os nucléolos coram como múltiplos corpos sólidos no interior do núcleo. Centrómero: manchas grandes de número finito. Segregados de antigénio reactivo com cromossomas condensados em células que estão a sofrer mitose.

A especificidade de alguns dos anticorpos dados os padrões de coloração acima descritos pode ser posteriormente identificada por testes para anticorpos anti-nADN e para vários antigénios nucleares extraíveis. Estes podem ser importantes no diagnóstico conforme indicado na Tabela 1, na parte final 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 ficar corado, os AMA devem ser quantificados no rim.

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

Os anticorpos anti-LKM exibem uma coloração citoplasmática granular característica das células do parênquima hepático e dos túbulos proximais do rim. As reacções no estômago são habitualmente negativas.

LIMITAÇÃO DO PROCEDIMENTO

Em alguns casos, soros positivos para ANA podem ser muito fracos ou negativos na diluição inicial para despiste (fenómeno pró-zona). Nestes casos duvidosos, os soros devem ser analisados em diluições mais altas e, caso sejam positivos, deve determinar-se os títulos de anticorpos. Noutros casos, a presença de dois ou mais anticorpos num soro que sejam reactivos para o mesmo substrato pode originar uma interferência na sua detecção por

parte da imunofluorescência. Esta interferência pode resultar na falha de detecção de ANA ou na supressão do seu título se o anticorpo interferente tiver um título mais elevado do que o ANA. Todas as reacções ao ANA devem ser apresentadas. 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 hidralazina¹. 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 ESPERADOS

Conforme se pode observar nas tabelas 1-7, na parte final deste documento, os testes para anticorpos nucleares são utilizados para despiste de LES e de outras doenças imunológicas. Os AMA ocorrem em mais de 90% dos casos de cirrose biliar primária e em 3–11% dos casos de hepatite crónica. Os ASMA ocorrem na maioria dos casos de hepatite crónica activa e os AGPA estão frequentemente associados a anemia perniciosa e gastrite atrófica crónica. Os anticorpos anti-LKM encontram-se num subgrupo de doentes com hepatite auto-imune crónica idiopática^{18,20}. A maioria dos doentes com anticorpos anti-LKM apresentava doença hepática. Alguns doentes com anticorpos anti-LKM podem ter hepatite subclínica ou carcinoma hepatocelular. Os anticorpos anti-LKM identificam um subgrupo de hepatite crónica activa-HBsAg no qual os outros marcadores de auto-anticorpos estão ausentes. Além disso, estes doentes têm baixos níveis de IgA sérica. Ver tabela 7.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O sistema de teste para auto-anticorpos ImmuGlo™ foi comparado com outro teste de anticorpos por fluorescência disponível no mercado usando as células HEp-2 como substrato. A comparação incluiu 15 amostras de soro de indivíduos normais, bem como soros de doentes com diagnóstico de LES, lúpus eritematoso cutâneo sub agudo, escleroceria ou artrite reumatóide. Os soros foram testados de acordo com o procedimento e diluição de despiste recomendados pelo fabricante. Os resultados são mostrados na tabela 8, na parte final 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 9.

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 33: 167-240, 1982.
2. Kumar V, Beutner EH and Chorzelski TP. Autoimmunity of the skin. In "Concepts in Immunopathology", Vol 1, Cruse JM and Lewis RE Jr, Eds, Karger, Basel, 318-353, 1985.
3. Reimer G, Cornell RC and Tan EM. The biochemical nature of nuclear antigens reactive with antinuclear antibodies. In "Immuno- pathology 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: 419-428, 1976.
17. Bigazzi PE, Burek CL and Rose NR. Antibodies to tissue-specific endocrine, gastrointestinal and neurological antigens. In "Manual of Clinical Laboratory Immunology". Rose NR, Friedman H and Fahey JL, Eds, American Society for Microbi- ology, Washington DC, 762-770, 1986.
18. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopa- thology 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

IF Staining Pattern	Nature of Antigen	Associated Disease
Homogeneous	dsDNA/Histones	SLE
Nuclear Membranous	Laminins	SLE, vasculitis or chronic Hepatitis
Speckled	RNP	SLE or MCTD*
	Sm	SLE
	SS-A/SS-B	SLE or Sjögren's Syndrome
	Scl-70	Scleroderma
Nucleolar	RNAPI	Scleroderma
	Pm-Scl	
Centromere/Kinetochores	inner and outer plates of kinetochores	CREST syndrome

*Mixed Connective Tissue Disease

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Adapted from Anderson P, et al.¹³ Muratori P, et al²⁵

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

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

Table 7. Characteristics of LKM Antibody Positive Patients

	Condition	% Incidence
Sex (F/M)	4:1	
Age	Mean 34 years	
HBsAg	Negative	
	Other Autoantibodies	
	Anti-nuclear	12%
	Anti-smooth muscle	18%
	Anti-mitochondrial	0%
	Anti-thyroglobulin	12%
	Anti-microsomal	35%
	Immunoglobulin levels (gm/dl)	
	IgG	Normal
	IgM	Normal
	IgA	Low

Adapted from Leung PSC, et al.²⁴

Table 8. Comparison of IFA Antibody Detection Systems

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

Table 9. Comparison of Kits Using Tissue Sections or HEp-2 Cells for the Detection of ANA

Clinical Condition	n	% Positive		
		Immco™ Mouse Liver	Other Mouse Kidney	Other HEp-2
SLE	21	95	95	86
Scleroderma	17	82	88	77
RA	20	25	25	5
Normal Controls	96	0	0	0

Adapted from Miller MH, et al.²⁷



For technical assistance please contact:

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

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

E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



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

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,

The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

www.emergogroup.com