



ImmuGlo™ AUTOANTIBODY TEST SYSTEM

For *in vitro* Diagnostic Use



| | | | |
|------------|-------|---------|---|
| REF | Code: | 1100 | Mouse Liver Substrate 48 Determinations |
| REF | Code: | 1107 | COMVI Mouse Kidney/Stomach Substrate 48 Determinations |
| REF | Code: | 1136 | COMVI-III Mouse Kidney/Stomach/Liver Substrate 48 Determinations |
| REF | Code: | 1136-96 | COMVI-III Mouse Kidney/Stomach/Liver Substrate 96 Determinations |

PRODUCT INSERT

INTENDED USE

Indirect immunofluorescence (IF) antibody tests for the detection and quantitation of anti-nuclear antibodies (ANA) *Code: 1100, 1107, 1136, 1136-96*, anti-mitochondrial antibodies (AMA), anti-smooth muscle antibodies (ASMA) and anti-gastric parietal cell antibodies (AGPA) *Catalog No. 1107, 1136, 1136-96*, in human serum.

SUMMARY AND EXPLANATION

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

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

PRINCIPLES OF PROCEDURE

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

PRODUCT INFORMATION

Storage and preparation

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

Materials provided

| | | |
|------------|--|-------------------|
| REF | 1100 Mouse Liver Substrate | 48 Determinations |
| REF | 1107 COMVI Mouse Kidney/Stomach Substrate | 48 Determinations |
| REF | 1136 COMVI-III Mouse Kidney/Stomach/Liver Substrate | 48 Determinations |
| REF | 1136-96 COMVI-III Mouse Kidney/Stomach/Liver Substrate | 96 Determinations |

| | | |
|------------|--|--|
| 6 | SORB SLD 8 | 8 well Substrate Slides (1100, 1107, 1136) |
| 12 | SORB SLD 8 | 8 well Substrate Slides (1136-96) |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL + ANA * | ANA Positive Control. Contains human serum. |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL + AMA * | AMA Positive Control. Contains human serum. |
| 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. (1136-96 contains 2 x 5ml) |
| 1 x 5 ml | IgG-CONJ FITC EB ** | Anti-human IgG FITC Conjugate containing Evan's Blue. Protect from light. (1136-96EB contains 2 x 5ml) |
| 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 Counterstain. |
| 1 x 12 | COVER SLD | Coverslips. |

* Contains < 0.1% NaN₃

† Replaces conjugate without counterstain in Code numbers containing "EB"

Material required but not provided

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

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HbsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regardless of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹⁴.

WARNING - Sodium azide (NaN_3) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

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. Do not use beyond expiration date.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

PROCEDURE

Test Method

A. Screening

1. Dilute each patient serum 1:10 (Code 1107, 1136, 1136-96) with the Buffered Diluent provided (20 μl serum + 180 μl Diluent) or 1:20 (Code 1100) (10 μl serum + 190 μl Diluent). Do not dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
2. Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for 10-15 minutes. Carefully remove the slides without touching the substrate.
3. Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.
4. Invert dropper vial and gently squeeze to apply 1 drop (approximately 50 μl of the Negative Control to well #1. Similarly apply 1 drop of ANA Positive Control to well #2. If applicable, 1 drop of AMA Positive Control to well #3 (Code: 1107, 1136, 1136-96). Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur Pipette, apply 1 drop of patient's diluted serum (approximately 50 μl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.
6. Place the lid on the incubation chamber and incubate slides 30 minutes at room temperature.

7. Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately 10 ml PBS using a pipette, or rinse slide in beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash 10 minutes. Repeat process with all remaining slides.
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 desired, 2-3 drops of Evans blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.
12. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **To prevent slide from drying, proceed immediately with next step while slide is still wet.**
13. Mount the coverslip by applying **3 drops** of Mounting Medium evenly on the coverslip and place coverslip over slide. Avoid applying undue pressure and prevent lateral movement of the coverslip.
14. Repeat steps 12 and 13 for each slide.
15. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater.

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

B. Endpoint Determination (titration)

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

Preparation of Serial Dilutions

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

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

QUALITY CONTROL

Both a Positive and Negative Control should be included with each test run. The Negative Control should show no specific fluorescence of the nuclei, smooth muscle, tubules of the

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

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

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

INTERPRETATION OF RESULTS

The results of the tests for ANA, AMA, ASMA, and AGPA antibodies should be reported as negative (< 10) on kidney and stomach sections (*Code: 1107, 1136, 1136-96*), negative (<20) on liver sections (*Code: 1100*), or alternatively, positive with titer.

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

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

- Homogeneous:** The entire nucleus fluoresces evenly with a diffuse staining pattern.
- Peripheral (rim):** 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.

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 FIG 1 at the end of this document.

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

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

LIMITATION OF THE PROCEDURE

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

In some cases the presence of two or more antibodies in a serum which are reactive with

the same substrate may cause an interference in their detection by immunofluorescence. This interference may cause either failure to detect ANA or suppression of its titer if the interfering antibody has a higher titer than ANA. All ANA reactions should be reported.

EXPECTED VALUES

As seen in Tables 1, 2, 3, 4 and 5 at the end of this document, tests for nuclear antibodies are used to screen for SLE and certain other immunologic disturbances. AMA occur in over 90% of cases of primary biliary cirrhosis and 3-11% of cases of chronic hepatitis. ASMA occur in the majority of cases of chronic active hepatitis and AGPA are commonly associated with pernicious anemia and chronic atrophic gastritis.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The ImmuGlo™ Autoantibody Test System (Mouse Kidney/Stomach Sections) was compared with another commercially available fluorescent antibody test using mouse kidney/stomach as a substrate. The comparison included: 20 samples of ANA positive sera, 19 samples of AMA positive sera, 19 samples of ASMA positive sera, 20 samples of AGPA positive sera and 38 serum samples from normal subjects. Sera were tested starting at a 1:10 dilution with the procedure recommended by the manufacturer. These yielded comparable results as summarized in Tables 6 and 7 at the end of this document.



ImmGlo™ DETECTION DES AUTOANTICORPS



| | | | |
|------------|---------|---------------------------------------|-------------------|
| REF | 1100 | Foie de souris | 48 Déterminations |
| REF | 1107 | COMVI Rein/estomac de souris | 48 Déterminations |
| REF | 1136 | COMVI-III Foie/rein/estomac de souris | 48 Déterminations |
| REF | 1136-96 | COMVI-III Foie/rein/estomac de souris | 96 Déterminations |

Test par immunofluorescence indirecte pour la recherche et la détermination quantitative des anticorps antinucléaires (ANA) Code: 1100, 1107, 1136, 1136-96, anticorps anti-mitochondries (AMA), anticorps anti-muscle lisse (ASMA) et anticorps anti-cellule pariétale gastrique (AGPA) Code: 1107, 1136, 1136-96 dans le sérum humain.

GENERALITES

Anticorps antinucléaires (ANA) aide dans le diagnostic des désordres de tissu connectif comprenant la lupus érythémateux disséminé (SLE), le Syndrome de Sjögren, la sclérodermie et les connectivites mixtes¹⁻⁵. ANA se produisent dans environ 95% de patients de SLE aussi bien que des patients présentant d'autres maladies de tissu connectif. ANA peut également se produire dans d'autres désordres tels que l'hépatite active chronique et la cirrhose biliaire primaire (PBC)⁶⁻⁸.

Anticorps anti-mitochondries (AMA) se produisent dans plus de 90% de cas biliaires primaires de cirrhose, 3-11% de patients actifs chroniques d'hépatite et sont absents dans les patients présentant l'obstruction biliaire supplémentaire-hépatique et dans d'autres affections hépatiques. La présence d'AMA en tous les cas de PBC et l'absence de ces anticorps dans l'ictère supplémentaire-hépatique les rend utiles en diagnostiquant ces maladies⁶⁻¹².

Anticorps anti-muscle lisse (ASMA) dans le titre élevé (≥ 160) se produisent dans la majorité de cas d'hépatite active chronique et dans les titres intermédiaires (40-80) dans l'hépatite virale aiguë. De temps en temps ils peuvent se produire 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 titres peuvent se produire dans les individus normaux^{13,14}.

Anticorps anti-cellule pariétale gastrique (AGPA) sont généralement associés à l'anémie pernicieuse et à la gastrite atrophique chronique où ils se produisent dans environ 90% et 50% de cas, respectivement. Cependant, ils ne sont pas détail de la maladie car ils peuvent se produire dans de basse fréquence dans d'autres maladies. Bien que les individus en bonne santé puissent avoir AGPA, ceci qui trouve peut refléter la gastrite atrophique asymptomatique. Les résultats négatifs pour AGPA fournissent l'évidence forte pour exclure l'anémie pernicieuse de la considération¹⁵⁻¹⁷.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce coffret, le sérum du patient est incubé sur des substrats rein/estomac de souris, ce qui permet la fixation des

autoanticorps avec le substrat. Un lavage 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 fixés de classe IgG. Les réactives sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert-pomme du structures spécifique histologique montre la présence d'ANA, ASMA, AMA et AGPA. Le titre du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) est alors déterminé par dilutions sériques successives ¹⁸.

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

Materials provided

| | | | |
|------------|--|---|-------------------|
| REF | 1100 | Foie de souris | 48 Determinations |
| REF | 1107 | COMVI Rein/estomac de souris | 48 Determinations |
| REF | 1136 | COMVI-III Foie/rein/estomac de souris | 48 Determinations |
| REF | 1136-96 | COMVI-III Foie/rein/estomac de souris | 96 Determinations |
| 6 | SORB SLD 8 | Lames 8 puits (1100, 1107, 1136) | |
| 12 | SORB SLD 8 | Lames 8 puits (1136-96) | |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL + ANA * | Contrôle positif ANA , sérum humain. | |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL + AMA * | Contrôle positif AMA , sérum humain. | |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL - * | Contrôle négatif , sérum humain. | |
| 1 x 5 ml | IgG-CONJ FITC * | Conjugué FITC anti-IgG humaines. Maintenir à l'abri de la lumière. (1136-96 contient 2 x 5ml) | |
| 1 x 5 ml | IgG-CONJ FITC EB ** | Conjugué FITC anti-IgG humaines avec de la Evan's Blue. Maintenir à l'abri de la lumière. (1136-96EB contient 2 x 5ml) | |
| 1 x 60 ml | BUF * | Diluant sérum. | |
| 2 fioles | 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 | Lamelles couvre-lames. | |

* Contient < 0.1% NaN₃

† Remplace le conjugué sans la **ontre colorant Bleu d'Evans** dans des numéros contenant "EB"

Matériel nécessaire mais non fourni

Microscope à fluorescence
Micropipette ou pipette Pasteur
Pipette sérologique
Bac à coloration pour le lavage des lames
Petits tubes (ex 13X75 mm) et portoir
Eau distillée ou déionisée
Eprouvette graduée 1l
Flacon pour solution de lavage
Serviettes en papier
Chambre d'incubation

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic in vitro. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et trouvé non réactif en antigène 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'usage¹⁴.

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium. Ce composé peut former avec des canalisations de plomb ou de cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, lors de l'élimination de ces réactifs dans un évier, rincer l'évier à grande eau.

La qualité des résultats est dépendante du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du coffret composants par d'autres provenant d'autres fabricants.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Seuls les sérums peuvent être utilisés dans ce test. Il est recommandé de ne pas les utiliser les sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne pouvant provoquer des interférences avec les performances du test. Conserver les sérums à 2-8°C pendant une semaine au maximum. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

MODE OPÉRATOIRE

A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:10 (Code 1107, 1136, 1136-96) dans le diluant échantillon fourni (20µl de sérum + 180µl de diluant) ou 1:20 (Code 1100) (10 µl de sérum + 190µl de diluant) . Ne pas diluer les contrôles positifs ou négatifs. Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des autoanticorps dans le cas où le dépistage sera trouvé positif.
2. Laisser revenir les lames à 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 en chambre humide avec des serviettes papier mouillées pour éviter l'assèchement.
4. Appuyer doucement sur le flacon pour déposer 1 goutte (environ 50µl) de Contrôle Négatif sur le puits #1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif ANA sur le puits #2. Si c'est approprié, déposer 1 goutte de Contrôle Positif AMA sur le puits #3 (Code: 1107, 1136, 1136-96). Eviter de déborder des puits.

5. Avec une micropipette ou une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50µl) de sérum dilué dans les puits restants. Eviter de déborder les puits.
6. Recouvrir la chambre humide et incuber les lames 30 minutes à température ambiante.
7. Sortir une lame de la chambre humide. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette et environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un bécher 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 lame du bac. Eliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Déposer la lame dans la chambre humide. Déposer immédiatement 1 goutte de conjugué dans chaque puits.
9. Répéter les étapes 7 et 8 avec chaque lame.
10. Recouvrir la chambre humide et incuber 30 minutes à température ambiante.
11. Sortir une lame de la chambre humide. Plonger la lame dans un bécher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Si une contre-coloration est souhaitée, ajouter 2-3 gouttes de Bleu d'Evans dans le dernier bain de lavage. Répéter les opérations avec toutes les lames.
REM: Un lavage incorrect peut altérer la morphologie des neutrophiles et provoquer un bruit de fond de fluorescence.
12. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS sur une serviette papier. Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est humide.
13. Déposer doucement 3 gouttes de milieu de montage dans la lamelle couvre-lame également 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 à 2-8°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 (Code: 1107, 1136, 1136-96) or 1:40 (Code: 1100). Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

Préparation des dilutions en série

Numéroter quatre tubes de 1 à 6. Ajouter 1ml de diluant échantillon dans le tube 1 et 0.2 ml dans les tubes 2 à 4. Pipetter 50 µl de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 0.2 ml du tube 1 dans le tube suivant et après agitation répéter la même opération pour les tubes suivants comme indiqué dans le tableau ci-dessous:

| 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. |

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série. Le contrôle négatif ne donne pas d'image fluorescente sur les noyaux, muscle lisse, tubules du rein ou cellules pariétales gastriques, tandis qu'avec le contrôle positif AMA on obtient une fluorescence 2+ ou supérieure du tubules du rein et qu'avec le contrôle positif AMA on obtient une fluorescence 2+ ou supérieure du noyaux du rein avec une modèle principalement homogène. Dans le cas où les contrôles ne donnent pas les résultats attendus, il est recommandé de refaire le test. Si le problème persiste, cela peut être lié à :

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

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats des essais pour des anticorps d'ANA, d'AMA, d'ASMA, et d'AGPA devraient être rapportés en tant que négatif (< 10) sur des sections de rein et d'estomac (*Code : 1107, 1136, 1136-96*), négatif (< 20) sur des sections de foie (*Code : 1100*), ou alternativement, positif avec le titre.

Zones de visualisation seulement qui contiennent la souillure spécifique des noyaux du rein pour ANA, les tubes de rein pour AMA, les murs de vaisseau sanguin de rein pour ASMA et les cellules pariétales gastriques seulement pour AGPA. Toutes autres réactions devraient être rapportées en tant que négatif pour ANA, AMA, ASMA et/ou AGPA.

ANA peut être détecté sur tous les substrats mais devrait être mesuré sur le rein ou les cellules HEP-2. Les modèles de souillure nucléaires observables avec le substrat de rein ou les cellules HEP-2 fournies incluent homogène, périphérique (jante), tacheté et <<nucleolar>>. Le centromère souillant le modèle (inclut des cellules dans la mitose) est vu le plus facilement sur les cellules HEP-2. Ces modèles de souillure nucléaires sont décrits ci-dessous. Ils peuvent être l'un ou une combinaison de plusieurs modèles de souillure. Les derniers sont dus aux réactions de plusieurs différents antigènes nucléaires.

Homogène : Le noyau entier entre en fluorescence même avec un modèle de souillure diffus.

Périphérique (jante) : La membrane nucléaire souille le plus intensément avec l'intensité de souillure décroissante du nucléoplasme vers le centre du noyau.

Tacheté : Bruts discrets aux taches rondes fines entrent en fluorescence dans tout le noyau.

<<Nucleolar>> : Les <<nucleoli>> souillent en tant que corps pleins multiples dans le noyau.

La spécificité de certains des anticorps donnant les modèles de souillure ci-dessus peut être encore identifiée par des essais pour des anticorps au nDNA et à de divers antigènes nucléaires extractibles.

Ceux-ci peuvent être d'importance diagnostique comme énuméré dans FIG 1 à la fin de ce document.

On peut observer AMA sur les tubes distaux et proximaux du rein avec les tubes distaux souillant plus brillamment. Quoique le cytoplasme des cellules pariétales gastriques souille également, AMA devrait être dosé sur le rein.

On peut également observer la souillure des muscularis d'estomac et des glomérules de rein avec ASMA, mais seulement ASMA vu sur les murs de vaisseau sanguin du rein devrait être rapporté.

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 ce cas, préparer les dilutions en série de l'échantillon et déterminer le titre de l'anticorps.

Parfois la présence de deux ou plus autoanticorps différents dans le sérum peut créer des interférences en immunofluorescence. Cela peut masquer la détection de l'ANA ou cacher le titre si l'anticorps qui interfère a un titre plus élevé que celui des ANA. Toutes les réactions d'ANA devraient être rapportées.

Un ANA positif ne devrait pas être considéré diagnostique de SLE par lui-même. Ils se produisent également dans les patients présentant d'autres maladies de tissu connectif et certaines drogues telles que le procaïnamide et l'hydralazine peuvent induire un ANA positif ¹.

Le clinicien devrait considérer les résultats de tous les essais indirects positifs d'immunofluorescence avec les résultats d'autres essais en laboratoire et l'état clinique du patient en faisant un diagnostic.

VALEURS PRÉVUES

Comme vu dans les Tables 1, 2, 3, 4 et 5 à la fin de ce document, des essais pour les anticorps nucléaires sont employés pour examiner pour SLE et certaines autres perturbations immunologiques. AMA se produisent dans plus de 90% de cas de la cirrhose biliaire primaire et 3-11% de cas d'hépatite chronique. ASMA se produisent dans la majorité de cas d'hépatite active chronique et AGPA sont généralement associés à l'anémie pernicieuse et à la gastrite atrophique chronique.

PERFORMANCES

Le ImmuGlo Autoantibody Kit (rein/estomac de souris) a été comparé à un autre essai disponible dans le commerce d'anticorps fluorescent en utilisant le rein/estomac de souris comme substrat. La comparaison incluse : 20 échantillons de sérums positifs d'ANA, 19 échantillons de sérums positifs d'AMA, 19 échantillons de sérums positifs d'ASMA, 20 échantillons de sérums positifs d'AGPA et 38 échantillons de sérum provenant des sujets normaux. Les sérums étaient commencer examiné à une dilution 1:10 avec le procédé recommandé par le fabricant. Ceux-ci ont donné des résultats comparables comme récapitulé dans les Tables 6 et 7 à la fin de ce document.



ImmuGlo™ TEST DE DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS

IVD

| | | | |
|-----|---------|--|-------------------|
| REF | 1100 | Hígado de ratón | 48 Determinations |
| REF | 1107 | COMVI Riñón/estómago de ratón | 48 Determinations |
| REF | 1136 | COMVI-III Hígado/riñón/estómago de ratón | 48 Determinations |
| REF | 1136-96 | COMVI-III Hígado/riñón/estómago de ratón | 96 Determinations |

Test de detección de inmunofluorescencia indirecta para la detección y cuantificación de los anticuerpos antinucleares (ANA) *Code: 1100, 1107, 1136, 1136-96*, Anticuerpos antimitocondria (AMA), Anticuerpos anti-músculo liso (ASMA) y Anticuerpos anticélula parietal gástrica (AGPA) *Code: 1107, 1136, 1136-96*, en el suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Anticuerpos antinucleares (ANA) ayuda en la diagnosis de los desórdenes del tejido fino conectivo incluyendo lupus eritematoso sistémico (SLE), el síndrome de Sjögren el escleroderma y enfermedades combinadas del tejido conectivo¹⁻⁵. ANA ocurren en el cerca de 95% de pacientes de SLE así como pacientes con otras enfermedades del tejido conectivo. ANA puede también ocurrir en otros desórdenes tales como hepatitis activa crónica y cirrosis biliar primaria (PBC)⁶⁻⁸.

Anticuerpos antimitocondria (AMA) ocurren adentro sobre el 90% de casos de cirrosis biliar primaria, 3-11% de pacientes activos crónicos de la hepatitis y están ausentes en pacientes con la obstrucción biliar adicional-hepa'tica y en otras enfermedades del hígado. La presencia de AMA en todos los casos de PBC y la ausencia de estos anticuerpos en ictericia adicional-hepa'tica los hace útiles en diagnosticar estas enfermedades⁶⁻¹².

Anticuerpos anti-músculo liso (ASMA) en alto título (≥ 160) ocurre en la mayoría de casos de la hepatitis activa crónica y en los títulos intermedios (40-80) en hepatitis viral aguda. Pueden ocurrir de vez en cuando en casos de PBC donde también se encuentran en títulos intermedios. La significación de títulos de 20-40 es dudosa puesto que estos títulos pueden ocurrir en individuos normales^{13,14}.

Anticuerpos anticélula parietal gástrica (AGPA) se asocian comúnmente a anemia perniciosa y a la gastritis atrófica crónica donde ocurren en el cerca de 90% y el 50% de casos, respectivamente. Sin embargo, no son específico de la enfermedad pues pueden ocurrir en frecuencia baja en otras enfermedades. Aunque los individuos sanos pueden tener AGPA, éste que encuentra puede reflejar la gastritis atrófica crónica. Los resultados negativos para AGPA proporcionan evidencia fuerte para excluir anemia perniciosa de la consideración¹⁵⁻¹⁷.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Para la realización del método de inmunofluorescencia indirecta de este equipo tiene que incubarse el suero de los pacientes en sustrato riñón/estómago de ratón y, de este modo, permitir que los anticuerpos puedan unirse al sustrato. Cualquier anticuerpo no unido se

elimina mediante lavado del portaobjetos. Los anticuerpos unidos de la clase IgG se detectan mediante incubación del sustrato con un conjugado de IgG antihumano marcado con fluoresceína. Las reacciones se visualizan en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados. La presencia de ANA, ASMA, AMA and AGPA se demuestra mediante la presencia de fluorescencia de color verde estructuras histológicas específicas. Posteriormente se determina el título (valor recíproco de la mayor dilución que origina una reacción positiva) mediante diluciones seriadas ¹⁸.

INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

Almacenamiento y preparación

Almacenar todos los reactivos a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos pueden emplearse después de haber sido equilibrados a temperatura ambiente.

Materiales Suministrados

Materials provided

| | | | |
|------------|--|--|-------------------|
| REF | 1100 | Hígado de ratón | 48 Determinations |
| REF | 1107 | COMVI Riñón/estómago de ratón | 48 Determinations |
| REF | 1136 | COMVI-III Hígado/riñón/estómago de ratón | 48 Determinations |
| REF | 1136-96 | COMVI-III Hígado/riñón/estómago de ratón | 96 Determinations |
| 6 | SORB SLD 8 | Portaobjetos de 8 pocillos (1100, 1107, 1136) | |
| 12 | SORB SLD 8 | Portaobjetos de 8 pocillos (1136-96) | |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL + ANA * | Control positivo de ANA , suero humano. | |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL + AMA * | Control positivo de AMA , suero humano. | |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL - * | Control negativo , suero humano. | |
| 1 x 5 ml | IgG-CONJ FITC * | Conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC)-IgG anti humana . Proteger de la luz. (1136-96 contiene 2 x 5ml) | |
| 1 x 5 ml | IgG-CONJ FITC EB ** | Conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC)-IgG anti humana con azul de Evans . Proteger de la luz. (1136-96EB contiene 2 x 5ml) | |
| 1 x 60 ml | BUF * | Diluyente de la muestra . | |
| 2 frascos | BUF WASH | Fosfato salino tamponado (PBS) . Disolver cada vial en 1 litro. | |
| 1 x 5.0 ml | MOUNTING MEDIUM * | Medio de preparación . No congelar. | |
| 1 x 1.0 ml | EVANS | Colorante de contraste azul de Evans . | |
| 1 x 12 | COVER SLD | Cubreobjetos . | |

* PRECAUCIÓN - Contiene < 0.1% NaN₃

† Substitute **Conjugado sin azul de Evans** en los números de código que contienen el "EB"

Material necesario, pero no suministrado

Microscopio de fluorescencia
Micropipetas o pipeta Pasteur
Pipetas serológicas
Placa de tinción (por ejemplo, frasco de Coplin)
Tubos de ensayo pequeños (por ejemplo, 13 x 75 mm) y gradilla de tubos de ensayo
Agua destilada o desionizada
Envase de 1 litro
Frasco de lavado
Toallas de papel
Cámara de incubación

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*. Todos los componentes de derivados sanguíneos humanos han sido ensayados respecto a la presencia de HbsAg, VHC, VIH-1 y 2 y el virus linfotrofo de células T humanas (VLTH-I), siendo negativos en los ensayos necesarios según la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos). Todas las muestras de suero y los derivados sanguíneos humanos deben tratarse como un material potencialmente peligroso, independientemente de su origen. En consecuencia, deben seguirse unas prácticas de laboratorio adecuadas durante el almacenamiento, dispensación y eliminación de dicho material¹⁴.

PRECAUCIÓN - La azida sódica (NaN_3) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas muy explosivas. Después y desechar los líquidos, es necesario lavar con un volumen grande de agua para evitar la acumulación de azida. La azida sódica puede ser tóxica si se ingiere. En caso de ingestión, notificarlo inmediatamente al director del laboratorio o al centro toxicológico.

Para poder garantizar la obtención de resultados válidos, deben seguirse de forma exacta las instrucciones indicadas en este prospecto. No intercambiar componentes del equipo por otros diferentes que no tengan el mismo número de catálogo de IMMCO. No utilizar este equipo después de la fecha de caducidad.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para la realización de esta determinación sólo debe utilizarse suero. Las muestras con hemólisis macroscópica, lipémicas o contaminadas por microorganismos pueden interferir en el funcionamiento del ensayo y, por tanto, no deben ser utilizadas. Almacenar las muestras a una temperatura de 2-8°C durante un período no superior a una semana. Cuando se desee un almacenamiento más prolongado, el suero debe congelarse a una temperatura de -20°C. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

PROCEDIMIENTO

Método de ensayo

A. Detección sistemática

1. Diluir 1:10 (Code: 1107, 1136, 1136-96) el suero de cada paciente con el diluyente de la muestra suministrado (20 µl de suero + 180 µl del diluyente) o 1:20 (Code 1100) (10 µl de suero + 190 µl del diluyente) . No diluir los Controles Positivo o Negativo. Guardar el suero no diluido para la determinación del título de anticuerpos si los resultados son positivos.
2. Permitir que los pocillos de los portaobjetos que contienen el sustrato se equilibren a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraer con cuidado los portaobjetos sin tocar el sustrato.

3. Etiquetar los portaobjetos y colocarlos en una cámara de incubación cubierta con toallas de papel humedecidas con agua para evitar la desecación.
4. Invertir el vial cuentagotas y presionar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 μ l) del Control Negativo en el pocillo nº 1. De forma similar, aplicar una gota del Control Positivo ANA en el pocillo nº 2. Se aplicável, aplicar una gota del Control Positivo AMA en el pocillo #3 (Code: 1107, 1136, 1136-96). Evitar llenar demasiado los pocillos.
5. Con el empleo de una micropipeta o una pipeta Pasteur, colocar 1 gota del suero diluido del paciente (aproximadamente 50 μ l) en los restantes pocillos. Evitar llenar demasiado los pocillos.
6. Tapar la cámara de incubación e incubar los portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Quitar la tapa de la cámara de incubación. Coger el portaobjetos por el extremo y lavar suavemente con 10 ml de PBS mediante el empleo de una pipeta o lavar el portaobjetos en un vaso de precipitado lleno de PBS. No emplear un frasco de lavado. Transferir inmediatamente el portaobjetos al frasco de Coplin y dejarlo durante 10 minutos. Repetir el proceso con todos los portaobjetos restantes.
8. Extraer el portaobjetos del frasco de Coplin. Secar el extremo del portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Colocar el portaobjetos en la cámara de incubación, Invertir inmediatamente el vial cuentagotas del Conjugado y apretar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 μ l) en cada pocillo.
9. Repetir las etapas 7 y 8 con cada portaobjetos.
10. Tapar la cámara de incubación. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Extraer el portaobjetos del incubador. Sumergir el portaobjetos en un vaso de precipitado con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Colocar el portaobjetos en una cubeta de tinción llena con PBS durante 10 minutos. Al final del lavado puede añadirse, si se desea, 2-3 gotas de colorante de contraste azul de Evans. Repetir el proceso con los portaobjetos restantes. NOTA: un lavado inadecuado puede repercutir en la morfología de los neutrófilos y puede originar un incremento de la fluorescencia de fondo.
12. Extraer el portaobjetos de la cubeta de tinción. Secar el portaobjetos con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Para evitar que se seque el portaobjetos, realizar inmediatamente, mientras el portaobjetos todavía está húmedo, el proceso descrito en el apartado 13.
13. Añadir 3 gota del Medio de Preparación uniformemente en cubreobjetos y colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos. Evitar la aplicación de una presión excesiva y el movimiento lateral del cubreobjetos.
14. Repetir las etapas 12 y 13 con cada portaobjetos.
15. Examinar el desarrollo de fluorescencia específica en un microscopio de fluorescencia a 200x o más aumentos.

Los portaobjetos pueden leerse al terminar su preparación. Sin embargo, debido a que el medio de preparación contiene un agente antidesfibrinación, puede retrasarse la lectura durante un período de hasta 48 horas sin que se produzca una pérdida significativa de la intensidad de la tinción. Los portaobjetos deben almacenarse en la oscuridad a una temperatura de 2-8°C.

B. Determinación del punto de valoración (titulación)

Los sueros positivos durante el ensayo pueden valorarse de forma adicional, etapas 6 - 15, para determinar su titulación. Cada ensayo debe incluir un control positivo y negativo. Realizar diluciones seriadas dobles a partir de 1:10 (Code: 1107, 1136, 1136-96) o 1:40 (Code: 1100). El título es el valor recíproco de la dilución más elevada que produzca una reacción positiva.

Preparación de las diluciones seriadas

Numerar cuatro tubos del 1 al 6. Añadir 1,0 ml del diluyente de la muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 4. Pipetear 0,05 ml del suero no diluido en el tubo 1 y mezclar

minuciosamente. Transferir 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezclar meticulosamente. Continuar transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente tras la mezcla y, de este modo, conseguir las diluciones ilustradas 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 |
| | | ↙ | ↙ | ↙ | ↙ | ↙ |
| Transferencia | | 0,2 ml | 0,2 ml | 0,2 ml | 0,2 ml | 0,2 ml |
| Dilución final | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 etc. |

CONTROL DE CALIDAD

En cada serie de ensayos debe incluirse un control positivo y negativo. El control negativo no debe mostrar fluorescencia específica de los núcleos, músculo liso, tubules del riñón o células parietales gástricas; por el contrario, el control positivo AMA debe tener una intensidad de tinción igual o superior a 2+ del tubules del riñón y el control positivo ANA debe tener una intensidad de tinción igual o superior a 2+ del los núcleos con un patrón predominante homogéneo.

Cuando no se obtienen los resultados esperados, debe repetirse el ensayo. Los resultados anómalos con los controles pueden producirse por:

- Turbidez. Desechar y utilizar otro control.
- Problemas del sistema óptico del microscopio de fluorescencia. Estos problemas pueden incluir un alineamiento inadecuado, una lámpara con fecha posterior a la esperanza de vida útil, etc.
- Secado del portaobjetos durante el procedimiento.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de las pruebas para los anticuerpos de ANA, AMA, ASMA, y AGPA se deben divulgar como negativa (< 10) en las secciones del riñón y del estómago (*Code: 1107, 1136, 1136-96*), negativo (< 20) en las secciones del hígado (*Code: 1100*), o alternativamente, positivo con título.

Solamente leído campos que contienen mancharse específico de los núcleos del riñón, los tubos del riñón para AMA, las paredes del vaso sanguíneo del riñón para ASMA y las células parietales gástricas solamente para AGPA. El resto de las reacciones se deben divulgar como negativa para ANA, AMA, ASMA y/o AGPA.

ANA puede ser detectado en todos los sustratos pero debe ser cuantificado en el riñón o las células HEp-2. Los patrones que se manchan nucleares observables con el sustrato del riñón o las células HEp-2 proporcionadas incluyen homogéneo, periférico (borde), manchado y <<nucleolar>>. El <<centromere>> que mancha el patrón (incluye las células en mitosis) se ve lo más fácilmente posible en las células HEp-2. Estos patrones que se manchan nucleares se describen abajo. Pueden ser uno o una combinación de varios patrones que se manchan. El últimos son debido a las reacciones a varios diversos antígenos nucleares.

Homogéneo: El núcleo entero despiden luz fluorescente uniformemente con un patrón que se mancha difuso.

Periférico (borde): La membrana nuclear se mancha lo más intenso posible con la intensidad que se mancha que disminuye del nucleoplasma hacia el centro del núcleo.

Manchado: Gruesos discretos a los puntos redondos finos despiden luz fluorescente a través del núcleo.

<<Nucleolar>>: Los nucleolos se manchan como cuerpos sólidos múltiples dentro del núcleo.

La especificidad de algunos de los anticuerpos que dan los patrones que se manchan antedichos se puede identificar más a fondo por las pruebas para los anticuerpos al nDNA y a los varios antígenos nucleares extractables.

Éstos pueden estar de significación de diagnóstico según lo enumerado en FIG 1 en el extremo de este documento.

AMA se puede observar en los tubos distal y próximos del riñón con los tubos distal que se manchan más brillantemente. Aunque el citoplasma de las células parietales gástricas también se mancha, AMA se debe cuantificar en el riñón.

El mancharse de los muscularis del estómago y de los glomeruli del riñón se puede también observar con ASMA, pero solamente ASMA visto en las paredes del vaso sanguíneo del riñón debe ser divulgado.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En algunos casos, el suero positivo de ANA puede ser muy débil o negativo en la dilución inicial del ensayo (fenómeno prozona). En dichos casos dudosos, debe efectuarse el ensayo con diluciones superiores, y en los casos positivos, debe determinarse el título. En algunos casos, la presencia de dos o más anticuerpos en el suero que reaccionan con el mismo sustrato puede originar una interferencia de su detección mediante inmunofluorescencia. Esta interferencia puede impedir la detección de ANA u originar una supresión si el título del anticuerpo de interferencia tiene un título superior al de ANA. Todas las reacciones de ANA deben ser divulgadas.

Un ANA positivo no debe ser considerado diagnóstico de SLE por sí mismo. También ocurren en pacientes con otras enfermedades del tejido fino conectivo y ciertas drogas tales como procainamide y hydralazine pueden inducir a un ANA positivo ¹. Por otra parte, los sueros de pacientes con cáncer y enfermedades infecciosas pueden también tener ANA positivo ²⁰.

El clínico debe considerar los resultados de todas las pruebas indirectas positivas de la inmunofluorescencia junto con los resultados de otros pruebas de laboratorio y la condición clínica del paciente al hacer una diagnosis.

VALORES PREVISTOS

Según lo considerado en Tables 1, 2, 3, 4 y 5 en el extremo de este documento, las pruebas para los anticuerpos nucleares se utilizan para defender para SLE y ciertos otros disturbios inmunológicos. AMA ocurren adentro sobre el 90% de casos de la cirrosis biliar primaria y 3-11% de casos de la hepatitis crónica. ASMA ocurren en la mayoría de casos de la hepatitis activa crónica y AGPA se asocian comúnmente a anemia perniciosa y a gastritis atrófica crónica.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL FUNCIONAMIENTO

El ImmGlo Kit (riñón/estómago de ratón) de fue comparado con otra prueba comercialmente disponible del anticuerpo fluorescente usando el riñón/estómago de ratón sustrato. La comparación incluida: 20 muestras de los sueros positivos de ANA, 19 muestras de los sueros positivos de AMA, 19 muestras de los sueros positivos de ASMA, 20 muestras de los sueros positivos de AGPA y 38 muestras del suero de temas normales. Los sueros eran el comenzar probado en una dilución 1:10 con el procedimiento recomendado por el fabricante. Éstos rindieron resultados comparables según lo resumido en Tables 6 y 7 en el extremo de este documento.



ImmuGlo™ TESTSYSTEM FÜR AUTOANTIKÖRPER



| | | | |
|------------|---------|----------------------------------|-------------------|
| REF | 1100 | Mouse Maus Leber | 48 Determinations |
| REF | 1107 | COMVI Maus Niere/Magen | 48 Determinations |
| REF | 1136 | COMVI-III Maus Leber/Niere/Magen | 48 Determinations |
| REF | 1136-96 | COMVI-III Maus Leber/Niere/Magen | 96 Determinations |

Für den Nachweis und die quantitative Bestimmung von Anti-nukleäre Antikörper (ANA) Code: 1100, 1107, 1136, 1136-96, Antimitochondriale Antikörper (AMA), antiglatte Muskel Antikörper (ASMA) and anti-gastrischen Parietalzell Antikörper (AGPA) Code: 1107, 1136, 1136-96.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Anti-nukleäre Antikörper (ANA) Hilfsmittel in der Diagnose der Bindegewebestörungen einschließlich systemischem Lupus erythematoses (SLE), Sjögren Syndrom, Sklerodermie und Mischkollagenosen. ANA treten in ungefähr 95% von SLE Patienten sowie Patienten mit anderen Bindegewebekrankheiten auf. ANA kann in anderen Störungen wie chronischer aktiver Hepatitis und Primärgallenzirrrose (PBC) auch auftreten ⁶⁻⁸.

Antimitochondriale Antikörper (AMA) treten innen über 90% von Primärgallenzirrrose-Fällen auf, 3-11% von chronischen aktiven Hepatitispatienten und sind bei Patienten mit Extra-hepatischem Gallenhindernis und in anderen Leberkrankheiten abwesend. Das Vorhandensein von AMA in allen Fällen von PBC und in Ermangelung dieser Antikörper in der Extra-hepatischen Gelbsucht bildet sie nützlich, wenn es diese Krankheiten bestimmt ⁶⁻¹².

Antiglatte Muskel Antikörper (ASMA) im hohen Titer (\geq treten 160) in der Mehrheit einen Fällen chronischer aktiver Hepatitis und in Zwischentitern (40-80) in der akuten Virenhepatitis auf. Gelegentlich können sie in den Fällen von PBC auftreten, in dem sie auch in den Zwischentitern gefunden werden. Die Bedeutung von Titern von 20-40 ist zweifelhaft, da diese Titer in den normalen Einzelpersonen auftreten können ^{13,14}.

Anticorps anti-gastrischen Parietalzell (AGPA) sind allgemein mit schädlicher Anämie und chronischer atrophischer Gastritis, in der sie in ungefähr 90% und in 50% von Fällen auftreten, beziehungsweise verbunden. Jedoch sind sie nicht Krankheitsbesondere, da sie in Niederfrequenz in anderen Krankheiten auftreten können. Obgleich gesunde Einzelpersonen AGPA haben können, kann findenes dieses asymptomatische atrophischer Gastritis reflektieren. Negative Entdeckungen für AGPA liefern starken Beweis, um schädliche Anämie von der Betrachtung auszuschließen ¹⁵⁻¹⁷.

TESTPRINZIP

Bei dem in diesem Test eingesetzten indirekten Immunfluoreszenzverfahren werden Patientenserum mit Maus Niere/Magen inkubiert, um die Bindung von in den Seren vorhandenen Autoantikörpern an die Zellen zu ermöglichen. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Gebundene Antikörper vom Typ IgG werden durch Inkubation der Zellen mit Fluorescein-markiertem anti-Human-IgG nachgewiesen. Das Reaktionsmuster wird un-

ter einem Fluoreszenzmikroskop bewertet, das mit den entsprechenden Filtern ausgerüstet ist. Das Vorhandensein von ANA, ASMA, AMA und AGPA zeigt sich durch eine apfelgrüne spezifische Strukturen Fluoreszenz. Anschließend kann der Titer (der reziproke Wert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion zeigt) durch die Untersuchung einer Reihenverdünnung bestimmt werden ¹⁸.

PRODUKTINFORMATION

Lagerung und Handhabung

Alle Reagenzien sind bei 2-8°C zu lagern. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig, nachdem sie auf Raumtemperatur gebracht wurden.

In der Testpackung vorhandenes Material

| | | | |
|------------|---|---|-------------------|
| REF | 1100 | Mouse Maus Leber | 48 Determinations |
| REF | 1107 | COMVI Maus Niere/Magen | 48 Determinations |
| REF | 1136 | COMVI-III Maus Leber/Niere/Magen | 48 Determinations |
| REF | 1136-96 | COMVI-III Maus Leber/Niere/Magen | 96 Determinations |
| 6 | SORB SLD 8 | Objektträger zu 8 Auftragstellen (1100, 1107, 1136) | |
| 12 | SORB SLD 8 | Objektträger zu 8 Auftragstellen (1136-96) | |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL + ANA * | ANA Positive Kontrolle, Humanserum. | |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL + AMA * | AMA Positive Kontrolle, Humanserum. | |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL - * | Negative Kontrolle, Humanserum. | |
| 1 x 5 ml | IgG-CONJ FITC * | FITC-Konjugat, Anti-Human-IgG. Lichtgeschützt aufbewahren.(1136-96 enthält 2 x 5ml) | |
| 1 x 5 ml | IgG-CONJ FITC EB † | FITC-Konjugat, Anti-Human-IgG mit Evans Blau. Lichtgeschützt aufbewahren. (1136-96EB enthält 2 x 5ml) | |
| 1 x 60 ml | BUF * | Probendiluent. | |
| 2 Phiolen | BUF WASH | Phosphatgepuffertes Kochsalz (PBS). Inhalt eines Fläschchens in 1 Liter auflösen. | |
| 1 x 5.0 ml | MOUNTING MEDIUM * | Eindeckmittel. Nicht einfrieren. | |
| 1 x 1.0 ml | EVANS | Evans Blau Färbemittel. | |
| 1 x 12 | COVER SLD | Deckgläschen. | |

* enthält < 0.1% NaN₃

† Ersetzt Konjugat ohne Evans Blau Färbemittel in den Kennziffern, die "EB" enthalten.

Zusätzlich benötigtes Material

Fluoreszenzmikroskop
 Mikropipetten oder Pasteurpipetten
 Kolbenhubpipette
 Färbetrog (z.B. nach Coplin)
 Kleine Reagenzröhrchen (z.B. 12x75 mm) und dazu passende Gestelle
 Destilliertes oder entionisiertes Wasser

Behälter, 1 Liter
Papierhandtücher
Feuchte Kammer

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur für In-vitro-Diagnostik. Alle Bestandteile menschlichen Ursprungs wurden auf das Vorhandensein von HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV-1/HIV-2 und Anti-HTLV-1 mit FDA-zugelassenen Tests untersucht und für negativ befunden. Alle Humanseren und Produkte menschlichen Ursprungs sollten ungeachtet ihrer Herkunft als potentiell gefährlich gehandhabt werden. Diese Materialien und ihre Behältnisse sind nach geltenden Vorschriften und Richtlinien zu lagern und zu beseitigen¹⁴.

ACHTUNG - Natriumazid (NaN_3) kann mit Kupfer und Blei in Leitungen und Lötstellen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren. Um eine Bildung solcher Metallazide zu vermeiden, müssen Ausgüsse nach dem Ausgießen azidhaltiger Lösungen mit reichlich Wasser gespült werden. Natriumazid kann beim Verschlucken giftig sein. Fälle von Verschlucken sofort dem Laborleiter oder der Giftzentrale melden.

Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, ist das Testprotokoll unbedingt einzuhalten. Falls Kitreagenzien ersetzt werden müssen, sollten nur Artikel von IMMCO der gleichen Artikelnummer verwendet werden. Keine verfallenen Reagenzien verwenden.

PROBENGEWINNUNG UND HANDHABUNG

Bei diesem Verfahren sollte nur Serum verwendet werden. Deutlich hämolytische, lipämische oder mikrobiell kontaminierte Proben können die Leistung dieses Tests beeinträchtigen und sollten daher nicht verwendet werden. Proben sollten nicht länger als eine Woche bei 2-8 °C gelagert werden. Bei längerer Lagerung sollten sie bei -20°C eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Testmethode

A. Screening

1. Jedes Patientenserum mit dem Probediluent aus dem Kit 1:10 (Code: 1107, 1136, 1136-96) (20 µl Serum + 180 µl Diluent) verdünnen oder 1:20 (Code 1100) (10 µl Serum + 190 µl Diluent). Die positiven und negativen Kontrollen nicht verdünnen. Die unverdünnten Nativseren aufbewahren, um bei positivem Suchtestergebnis gegebenenfalls den Antikörpertiter bestimmen zu können.
2. Beutel mit den beschichteten Objektträgern auf Raumtemperatur bringen (10-15 Minuten). Objektträger vorsichtig entnehmen, ohne die Beschichtung zu berühren.
3. Objektträger beschriften und, um ein Austrocknen der Beschichtung zu verhindern, in eine feuchte Kammer legen.
4. Von den Tropffläschchen mit der Negativen und ANA Positiven Kontrolle jeweils 1 Tropfen (etwa 50 µl) auf die Auftragstellen #1 bzw. #2 ausdrücken. Wenn anwendbar, AMA Positiven Kontrolle #3 hinzufügen (Code: 1107, 1136, 1136-96). Auftragstellen nicht überfüllen.
5. Mit einer Mikro- oder Pasteurpipette 1 Tropfen verdünntes Patientenserum (etwa 50 µl) auf die weiteren Auftragstellen geben. Auftragstellen nicht überfüllen.
7. Jeweils einen Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen. Am beschrifteten Ende anfassen und sorgfältig mit ca. 10 ml PBS aus einer Pipette spülen; alternativ Objektträger in einem Becher mit PBS spülen. Keine Spritzflasche verwenden. Objektträger sofort in einen Färbetrog mit PBS für 10 Minuten stellen. Mit den anderen Objektträgern ebenso verfahren.
8. Objektträger einzeln aus dem Färbetrog nehmen. Längsseite des Objektträgers gegen ein

Papiertuch halten, um Überschuß an PBS zu entfernen. Objektträger in die feuchte Kammer legen und sofort vom Tropffläschchen mit Konjugat 1 Tropfen (ca. 50 µl) auf jede Auftragstelle ausdrücken.

9. Die Schritte 7 und 8 mit jedem Objektträger einzeln durchführen.
10. Feuchte Kammer abdecken und Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Jeweils einen Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen. Am beschrifteten Ende anfassen und in einen Becher mit PBS eintauchen, um Überschuß an Konjugat zu entfernen. Objektträger 10 Minuten in einen Färbetrog mit PBS stellen. Falls Gegenfärbung gewünscht ist, können 2-3 Tropfen Evans Blau Färbemittel pro Trog hinzugefügt werden. Mit den anderen Objektträgern ebenso verfahren. HINWEIS: Unsachgemäßes Waschen kann die Morphologie der neutrophilen Zellen beeinträchtigen und eine erhöhte Hintergrundfluoreszenz bewirken.
12. Objektträger einzeln aus dem Färbetrog nehmen. Längsseite des Objektträgers gegen ein Papiertuch halten, um Überschuß an PBS zu entfernen. Um ein Austrocknen der Beschichtung zu vermeiden, sofort mit Schritt 13 fortfahren.
13. 3 Tropfen des Eindeckmittels sorgfältig auf Deckgläschen gleichmäßig geben und ein Deckgläschen auflegen. **Leicht** andrücken **und seitliche** Bewegung des Deckgläschens vermeiden.
14. Die Schritte 12 und 13 mit jedem Objektträger einzeln durchführen.
15. Auf spezifische Fluoreszenz hin unter einem Fluoreszenzmikroskop bei mindestens 200facher Vergrößerung auswerten.

Die Objektträger können sofort nachdem sie angefertigt wurden ausgewertet werden. Weil das Eindeckmittel einen Stoff enthält, der einem Ausbleichen entgegenwirkt, können die Objektträger jedoch bis 48 Std. später ausgewertet werden, ohne daß die Intensität der Fluoreszenz signifikant abklingt. Die Objektträger sollten im Dunkeln bei 2-8°C gelagert werden.

B. Titerbestimmung

Bei einem im Suchtest positiven Serum kann nach Durchführung der Schritte 5 bis 13 der Titer bestimmt werden. Zu diesem Zweck ist ausgehend von einer 1:10 (Code: 1107, 1136, 1136-96) or 1:40 (Code: 1100) -Verdünnung eine Reihenverdünnung zu erstellen.

Bei jedem Testlauf sollten die positive und negative Kontrolle mitgeführt werden. Der Titer ergibt sich aus dem reziproken Wert der höchsten Verdünnung, die ein positives Ergebnis zeigt.

Herstellung einer Reihenverdünnung

Vier Röhrrchen mit 1 bis 6 beschriften. Vom Probendiluent 1000 µl in Röhrrchen 1 und jeweils 200 µl in Röhrrchen 2 bis 4 geben. 50 µl unverdünntes Serum in Röhrrchen 1 pipettieren und gründlich durchmischen. Aus Röhrrchen 1 200 µl ins Röhrrchen 2 überführen und gründlich durchmischen. Die Verdünnungsreihe wie in der folgenden Tabelle dargestellt fortführen, indem nach Durchmischen jeweils 200 µl von einem Röhrrchen in das nächste überführt werden.

| Röhrrchen | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| Serum | 0,1 ml | | | | | |
| | + | | | | | |
| Probendiluent | 0,9 ml | 0,2 ml | 0,2 ml | 0,2 ml | 0,2 ml | 0,2 ml |
| | | ⇄ | ⇄ | ⇄ | ⇄ | ⇄ |
| Zu überführen | | 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 etc. |

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf sollten sowohl eine positive wie eine negative Kontrolle mitgeführt werden. Die negative Kontrolle sollte keine spezifische Fluoreszenz der Kerne, glatter Muskel, tubules der Niere oder gastrische parietal Zellen zeigen. Die AMA-positive Kontrolle sollte eine

Fluoreszenzintensität von mindestens 2+ im tubules der Niere. Die ANA-positive Kontrolle sollte eine Fluoreszenzintensität von mindestens 2+ im Kerne mit ein überwiegend homogenes Muster.

Werden die erwarteten Ergebnisse nicht erhalten, sollte der Testlauf wiederholt werden. Sind die Ergebnisse mit den Kontrollen auch dann nicht wie erwartet, kann dies folgende Ursachen haben:

- Trübungen. Kontrolle(n) verwerfen und eine neue verwenden.
- Probleme mit der Optik des Mikroskops, wie z.B.: unsachgemäße Ausrichtung, Lampe zu alt, usw.
- Objektträgerbeschichtung während Testdurchführung ausgetrocknet.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Resultate der Tests für ANA, AMA, ASMA und AGPA Antikörper sollten als Negativ (< 10) auf Niere- und Magenabschnitten berichtet werden (*Code: 1107, 1136, 1136-96*), negativ (< 20) auf Leber(*Code: 1100*), oder wechselweise, positiv mit Titer.

Gelesen fängt nur auf, die das spezifische Beflecken der Kerne der Niere, das für ANA beobachtet werden, die Niere Schläuche für AMA, die Niereblutgefäßwände für ASMA und gastrische parietal Zellen nur für AGPA enthalten. Alle weiteren Reaktionen sollten als Negativ für ANA, AMA, ASMA und/oder AGPA berichtet werden.

ANA kann, auf allen Substraten ermittelt werden aber sollte auf der Niere oder die Zellen quantitativ bestimmt werden HEp-2. Die befleckenden Kernmuster, die mit dem Nieresubstrat oder den Zellen HEp-2 bereitgestellt werden wahrnehmbar sind, schließen homogenes, Zusatz- (Kante), gesprenkeltes und <<nucleolar>> mit ein. Der <<Centromere>>, der Muster befleckt (schließt Zellen im Mitosis) wird leicht auf Zellen HEp-2 gesehen. Diese befleckenden Kernmuster sind unten beschrieben. Sie können eins oder eine Kombination einiger befleckender Muster sein. Die letzten liegen an den Reaktionen zu einigen unterschiedlichen Kernantigenen.

| | |
|-----------------------------------|---|
| Homogen: | Der gesamte Kern fluoresziert gleichmäßig mit einem verbreiteten befleckenden Muster. |
| Peripherie (Kante): | Die Kernmembrane befleckt am intensivsten mit abnehmender befleckender Intensität des Zellkernplasmas zur Mitte des Kernes. |
| Gesprenkelt: | Getrennte grobe zu den feinen runden Tupfen fluoreszieren während des Kernes. |
| <<Nucleolar>>: | Die <<Nucleoli>> beflecken als mehrfache Festkörper innerhalb des Kernes. |

Die Besonderheit von einigen der Antikörper, welche die oben genannten befleckenden Muster geben, kann durch Tests für Antikörper zum nDNA und zu den verschiedenen ausziehbaren Kernantigenen weiter gekennzeichnet werden.

Diese können von der Diagnosebedeutung sein, wie aufgeführt in FIG 1 am Ende dieses Dokumentes.

AMA kann auf den distalen und proximalen Schläuche der Niere mit den distalen Schläuche beobachtet werden, die heller beflecken. Obwohl der Zytoplasma der gastrischen parietal Zellen auch befleckt, sollte AMA auf der Niere quantitativ bestimmt werden.

Das Beflecken der Magen muscularis und der Nieregefäßknäuel kann mit ASMA auch beobachtet werden, aber nur ASMA, das auf die Blutgefäßwände der Niere gesehen wird, sollte berichtet werden.

GRENZEN DES VERFAHRENS

In seltenen Fällen können hochtitrige ANA-Seren mit der ursprünglichen Suchtestverdünnung negativ bis schwach positiv reagieren (Prozonphänomen). Im Zweifelsfall sollten solche Seren mit einer höheren Verdünnung getestet und bei positivem Ergebnis titriert werden.

Enthält ein Patientenserum zwei oder mehrere Antikörper, die mit dem selben Substrat reagieren, so kann ihr Nachweis mit der indirekten Immunfluoreszenz aufgrund von Interferenz erschwert sein. Diese Interferenz kann den Nachweis von ANA entweder vereiteln oder einen zu niedrigen ANA-Titer bewirken, falls der Titer des interferierenden Antikörpers höher ist. Alle ANA Reaktionen sollten berichtet werden.

Ein positiv ANA sollen nicht sein gelten Diagnose von SLE selbst durch sich. Sie treten auch bei Patienten mit anderen Bindegewebekrankheiten auf und bestimmte Drogen wie Procainamide und Hydralazin können einen positiven ANA verursachen¹. Außerdem können Seren der Patienten mit Krebs und ansteckenden Krankheiten positiven ANA auch haben²⁰.

Der Kliniker sollte die Resultate aller positiven indirekten Immunfluoreszenz- Tests zusammen mit den Resultaten anderer Laborversuche und dem klinischen Zustand des Patienten betrachten, wenn er eine Diagnose bildet.

ERWARTETE WERTE

Wie in Tables 1, 2, 3, 4 und 5 am Ende dieses Dokumentes, werden Tests für Kernantikörper gesehen benutzt, um für SLE und bestimmte andere immunologische Störungen auszusortieren. AMA treten innen über 90% von Fällen Primärgallenzirrhose und 3-11% von Fällen chronischer Hepatitis auf. ASMA treten in der Mehrheit einen Fällen chronischer aktiver Hepatitis auf und AGPASIND allgemein mit schädlicher Anämie und chronischer atrophischer Gastritis verbunden.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Das ImmuGlo Kit (Maus Niere/Magen) wurde mit einem anderen im Handel erhältlichen Test des Leuchtstoffantikörpers mit Maus Niere/Magen als Substrat verglichen. Der Vergleich eingeschlossen: 20 Proben ANA der positiven Seren, 19 Proben AMA der positiven Seren, 19 Proben ASMA der positiven Seren, 20 Proben AGPA der positiven Seren und 38 Serumproben von den normalen Themen. Seren waren geprüfetes Beginnen an einer Verdünnung 1:10 mit dem Verfahren, das durch den Hersteller empfohlen wurde. Diese erbrachten vergleichbare Resultate, wie in Tables 6 und 7 am Ende dieses Dokumentes zusammengefaßt.



ImmuGlo™ ANALISI DELL'AUTOANTICORPI

IVD

| | | | |
|------------|---------|---------------------------------------|-------------------|
| REF | 1100 | Fegato di topo | 48 Determinations |
| REF | 1107 | COMVI Rene/stomaco di topo | 48 Determinations |
| REF | 1136 | COMVI-III Fegato/rene/stomaco di topo | 48 Determinations |
| REF | 1136-96 | COMVI-III Fegato/rene/stomaco di topo | 96 Determinations |

Dosaggio in immunofluorescenza indiretta per l'individuazione e la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-nucleo (ANA) Code: 1100, 1107, 1136, 1136-96, anti-mitocondrio (AMA), anti-muscolo liscio (ASMA) e anti-gastric parietal cell antibodies (AGPA) Code: 1107, 1136, 1136-96 nel siero umano.

SUMMARY AND EXPLANATION

Anticorpi anti-nucleo (ANA) aiutano nella diagnosi dei disordini del tessuto connettivo compreso il lupus eritematoso sistemico (SLE), sindrome di Sjögren, scleroderma, e malattia del tessuto connettivo misto¹⁻⁵. ANA si presentano in circa 95% dei pazienti di SLE così come i pazienti con altre malattie del tessuto connettivo. ANA può anche accadere in altri disordini quali epatite attiva cronica e la cirrosi biliare primaria (PBC)⁶⁻⁸.

Anticorpi anti-mitocondrio (AMA) si presentano dentro più di 90% dei casi biliari primari di cirrosi, 3-11% dei pazienti attivi cronici di epatite e sono assenti in pazienti con l'ostruzione biliare supplementare-epatica ed in altre affezioni epatiche. La presenza di AMA in tutti i casi di PBC ed assenza di questi anticorpi nell'ittero supplementare-epatico li rende utili nella diagnostica delle queste malattie⁶⁻¹².

Anticorpi anti-muscolo liscio (ASMA) nell'alto titolo (≥ 160) si presenta nella maggior parte dei casi di epatite attiva cronica e nei titoli intermedi (40-80) nell'epatite virale acuta. Possono accadere occasionalmente nei casi di PBC dove inoltre sono trovati nei titoli intermedi. L'importanza dei titoli di 20-40 è dubbiosa poiché questi titoli possono accadere in individui normali^{13,14}.

Anticorpi anti-cellule parietali gastriche (AGPA) sono associati comunemente rispettivamente con l'anemia perniziosa e la gastrite atrofica cronica dove si presentano in circa 90% ed in 50% dei casi. Tuttavia, non sono malattia specifica poiché possono accadere in a bassa frequenza in altre malattie. Anche se gli individui in buona salute possono avere AGPA, questo che trova può riflettere la gastrite atrofica asintomatica. I risultati negativi per AGPA forniscono la prova ben fondata per escludere l'anemia perniziosa da considerazione¹⁵⁻¹⁷.

PRINCIPIO DEL METODO

Nella metodica in immunofluorescenza indiretta utilizzata in questo kit, i sieri dei pazienti vengono incubati su substrato rene/stomaco di topo per consentire il legame degli anticorpi al substrato. Tutti gli anticorpi non legati vengono eliminati sciacquando il vetrino, mentre gli anticorpi legati del tipo IgG vengono individuati mediante incubazione del substrato con

coniugato anti IgG umana, marcato con fluoresceina. Per osservare le reazioni si utilizza un microscopio a fluorescenza dotato di filtri adatti. Una fluorescenza verde mela del strutture istologico specifico conferma la presenza di ANA, ASMA, AMA e AGPA. Mediante l'analisi di diluizioni seriali si determina quindi il titolo (il reciproco della diluizione più elevata che causa una reazione positiva).¹⁸

CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

Conservazione e preparazione Conservare tutti i reagenti a una temperatura di 2-8°C. I reagenti sono pronti per l'uso dopo averli portati a temperatura ambiente.

Materiali forniti

| | | | |
|--------------|--|--|-------------------|
| REF | 1100 | Fegato di topo | 48 Determinations |
| REF | 1107 | COMVI Rene/stomaco di topo | 48 Determinations |
| REF | 1136 | COMVI-III Fegato/rene/stomaco di topo | 48 Determinations |
| REF | 1136-96 | COMVI-III Fegato/rene/stomaco di topo | 96 Determinations |
| 6 | SORB SLD 8 | Vetrini-substrato con 8 pozzetti (1100, 1107, 1136) | |
| 12 | SORB SLD 8 | Vetrini-substrato con 8 pozzetti (1136-96) | |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL + ANA * | Controllo positivo ANA, siero umano. | |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL + AMA * | Controllo positivo AMA, siero umano. | |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL - * | Controllo negativo, siero umano. | |
| 1 x 5 ml | IgG-CONJ FITC * | Coniugato FITC anti-IgG umana. Tenere lontano dalla luce. (1136-96 contiene 2 x 5ml) | |
| 1 x 5 ml | IgG-CONJ FITC EB ** | Coniugato FITC anti-IgG umana con Evan's Blue. Tenere lontano dalla luce. (1136-96EB contiene 2 x 5ml) | |
| 1 x 60 ml | BUF * | Diluente per campioni. | |
| 2 flaconcini | BUF WASH | Tampone fosfato-salino (PBS). Ricostituire ciascun flaconcino con 1 litro d'acqua. | |
| 1 x 5.0 ml | MOUNTING MEDIUM * | Tampone fosfato-salino (PBS). Ricostituire ciascun flaconcino con 1 litro d'acqua | |
| 1 x 1.0 ml | EVANS | Blu di Evans. | |
| 1 x 12 | COVER SLD | Vetrini coprioggetto. | |

* Contiene < 0.1% NaN₃

† Sostituisce il coniugato senza Blu di Evans nei numeri di codice che contengono "EB"

Materiali necessari ma non forniti

Microscopio a fluorescenza
 Micropipetta o pipetta Pasteur
 Pipette sierologiche
 Piastra di colorazione (ad esempio vaschetta di Coplin)
 Piccole provette (ad es. 13 x 75 mm) e porta provette
 Acqua distillata o deionizzata
 Contenitore da 1 litro

Bottiglia di lavaggio
Carta assorbente
Incubatore

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*. Il materiale di origine umana utilizzato nella preparazione dei reagenti è stato controllato ed è risultato negativo ai test richiesti dalla FDA per la presenza dell'HBsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I. Tuttavia, maneggiare tutti i campioni di siero umano e i prodotti di origine umana come fonte potenziale di infezione, indipendentemente dalla loro origine, seguendo le normali pratiche di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e l'eliminazione di questi materiali¹⁴. **ATTENZIONE** - La sodio azide (NaN_3) può dar luogo a reazioni chimiche pericolose. Per lo smaltimento dei residui delle analisi attenersi scrupolosamente alle norme CDC e alle norme di legge in materia. La sodio azide è tossica, se ingerita; in questo caso, informare immediatamente il responsabile del laboratorio o un centro per casi di avvelenamento.

Al fine di assicurare risultati validi, si raccomanda di attenersi alle istruzioni riportate in questo inserto. Non scambiare i componenti del kit se non con quelli aventi lo stesso numero di catalogo della IMMCO. Non utilizzare oltre la data di scadenza.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare soltanto campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o contaminati possono influenzare i risultati del test e vanno scartati. Conservare i campioni a una temperatura di 2-8°C per non oltre una settimana. Per periodi di conservazione più lunghi, congelare il siero a -20°C, evitando di congelare i campioni più volte.

PROCEDURA

Metodica d'analisi

A. Screening

1. Diluire ciascun siero di paziente 1:10 (Code: 1107, 1136, 1136-96) con il Diluente per Campioni fornito (20 μl di siero + 180 μl di Diluente) o 1:20 (Code 1100) (10 μl di siero + 190 μl di Diluente). **Non diluire i Controlli Positivi o Negativi.** Conservare i sieri non diluiti per determinare i titoli anticorpali se i test di screening risultano positivi.
2. Lasciare che i sacchetti contenenti i vetrini-substrato raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti, quindi estrarre i vetrini facendo attenzione a non toccare il substrato.
3. Marcare i vetrini e porli in una camera umida.
4. Capovolgere il flaconcino contagocce e versare delicatamente 1 goccia (circa 50 μl) del Controllo Negativo nel pozzetto no. 1. Allo stesso modo versare 1 goccia del Controllo Positivo ANA nel pozzetto no. 2. Se applicabile, allo stesso modo versare 1 goccia del Controllo Positivo AMA nel pozzetto no. 3 (Code: 1107, 1136, 1136-96). Evitando di riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Con una micropipetta o con la pipetta Pasteur, versare 1 goccia del siero diluito del paziente (circa 50 μl) negli altri pozzetti, evitando di riempirli eccessivamente.
6. Mettere il coperchio sulla camera umida ed incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
7. Togliere un vetrino dalla camera umida. Tenendo il vetrino per l'estremità della linguetta, sciacquarlo delicatamente con circa 10 ml di PBS utilizzando una pipetta o sciacquarlo in un becher pieno di PBS. Non utilizzare la bottiglia di lavaggio. Trasferire il vetrino immediatamente nella vaschetta di Coplin e lavare per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
8. Togliere il/i vetrino/i dalla vaschetta di Coplin. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Porre il vetrino nella camera umida. Capovolgere

immediatamente il flaconcino contagocce del Coniugato e versarne delicatamente 1 goccia (circa 50 µl) in ciascun pozzetto.

9. Ripetere i punti 7 e 8 per ciascun vetrino.
10. Riporre il coperchio sulla camera umida ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
11. Togliere un vetrino dalla camera umida e tenendolo per l'estremità della linguetta, immergerlo in un becher pieno di PBS per togliere il coniugato in eccesso. Porre il/i vetrino/i in una piastra di colorazione piena di PBS per 10 minuti. Se si desidera, si possono aggiungere 2-3 gocce di Blu di Evans al lavaggio finale. Ripetere per gli altri vetrini. **NOTA:** Un lavaggio scorretto può influenzare la morfologia dei neutrofili e causare una maggiore fluorescenza di fondo.
12. Togliere un vetrino dalla piastra di colorazione. Asciugare il bordo del vetrino su della carta assorbente per togliere la PBS in eccesso. Per evitare che il vetrino si secchi, passare immediatamente al punto 13 mentre è ancora bagnato.
13. Montare il vetrino coprioggetto versando delicatamente 3 **goccia** uniformemente di Terreno di allestimento su vetrino coprioggetto, quindi porre il coprioggetto sul vetrino. Non applicare eccessiva pressione ed evitare che il coprioggetto si sposti lateralmente.
14. Ripetere i punti 12 e 13 per ciascun vetrino.
15. Esaminare la fluorescenza specifica con un microscopio a fluorescenza a un ingrandimento di almeno 200x. I vetrini si possono leggere appena vengono preparati. Tuttavia, grazie a un agente anti evanescenza presente nel liquido di montaggio, non si verifica alcuna perdita significativa di intensità di colorazione, se la lettura viene posticipata fino a 48 ore. I vetrini devono essere conservati al buio a una temperatura di 2-8°C.

B. Determinazione dell'endpoint (Titolazione)

Un siero positivo al test di screening può essere ulteriormente analizzato seguendo i punti da 5 a 13 per determinarne il titolo. Ciascuna sessione analitica deve includere i Controlli Positivi e Negativi. Effettuare diluizioni seriali doppie partendo da (Code: 1107, 1136, 1136-96) or 1:40 (Code: 1100). Il reciproco della diluizione più elevata che produce una reazione positiva è il titolo.

Preparazione delle Diluizioni Seriali

Numerare quattro provette da 1 a 6. Aggiungere 1,0 ml di Diluente per Campioni alla provetta 1 e 0,2 ml alle provette da 2 a 4. Pipettare 0,05 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 all'altra dopo aver mescolato 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 QUALITA'

Ciascuna sessione analitica deve comprendere sia un Controllo Positivo che uno Negativo. Il Controllo Negativo non deve mostrare alcuna fluorescenza specifica dei nuclei, muscolo liscio, tubules del rene o cellule parietali gastriche, mentre il Controllo Positivo AMA deve avere un'intensità di colorazione dei tubules del rene di almeno 2+ e il Controllo Positivo ANA deve avere un'intensità di colorazione dei nuclei con un modello principalmente omogeneo. Se non si ottengono i risultati attesi, bisognerà ripetere l'analisi. Se continuano a verificarsi

risultati inadeguati con i controlli, le cause possono essere:

- Torbidità. Scartare e utilizzare un altro controllo.
- Problemi al sistema ottico del microscopio a fluorescenza, quali allineamento non corretto, bulbo scaduto, ecc.
- Essiccamento del vetrino durante la procedura.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati delle prove per gli anticorpi del ANA, di AMA, di ASMA e di AGPA dovrebbero essere segnalati come negazione (< 10) sulle sezioni dello stomaco e del rene (*Code: 1107, 1136, 1136-96*), negativo (< 20) sulle sezioni dello fegato (*Code: 1100*), o alternativamente, positivo con il titolo.

Soltanto colto campi che contengono la macchiatura specifica dei nuclei del rene, i tubi del rene per AMA, le pareti del vaso sanguigno del rene per ASMA e cellule parietali gastriche soltanto per AGPA. Tutte le altre reazioni dovrebbero essere segnalate come negazione per ANA, AMA, ASMA e/o AGPA.

ANA può essere rilevato su tutti i substrati ma dovrebbe essere misurato sul rene o le cellule HEP-2. I modelli di macchiatura nucleari osservabili con il substrato del rene o le cellule HEP-2 fornite includono omogeneo, periferico (orlo), macchiato e <<nucleolar>>. Il centromero che macchia il modello (include le cellule nella mitosi) è visto il più facilmente sulle cellule HEP-2. Questi modelli di macchiatura nucleari sono descritti qui sotto. Possono essere uno o una combinazione di parecchi modelli di macchiatura. Il posteriori sono dovuto le reazioni a vari antigeni nucleari.

Omogeneo: L'intero nucleo è fluorescente anche con un modello di macchiatura diffuso.

Unità periferica (orlo): La membrana nucleare macchia il più intensamente con intensità di macchiatura di diminuzione del nucleoplasma verso il centro del nucleo.

Macchiato: Di massima discreti alle macchioline rotonde fini sono fluorescenti durante il nucleo.

<<Nucleolar>>: I <<nucleoli>> macchiano come enti solidi multipli all'interno del nucleo.

La specificità di alcuni degli anticorpi che danno i suddetti modelli di macchiatura può più ulteriormente essere identificata dalle prove per gli anticorpi al nDNA ed ai vari antigeni nucleari estraibili.

Questi possono essere di importanza diagnostica come elencato in FIG 1 all'estremità di questo documento.

AMA può essere osservato sia sui tubi distali che prossimali del rene con i tubi distali che macchiano più brillantemente. Anche se il citoplasma delle cellule parietali gastriche inoltre macchia, AMA dovrebbe essere quantificato sul rene.

La macchiatura dei muscularis dello stomaco e dei glomeruli del rene può anche essere osservata con ASMA, ma soltanto ASMA visto sulle pareti del vaso sanguigno del rene dovrebbe essere segnalato.

LIMITI DELLA PROCEDURA

In alcuni casi, i sieri ANA positivi possono essere o molto deboli o negativi alla diluizione iniziale di screening (fenomeno di prozona). Quando si verificano questi casi dubbi, i sieri dovranno essere esaminati a diluizioni maggiori e, se positivi, dovranno essere determinati i titoli anticorpali.

In alcuni casi la presenza in un siero di due o più anticorpi reattivi con lo stesso substrato può causare un'interferenza nella loro individuazione mediante immunofluorescenza. Tale interferenza può provocare il mancato rilevamento degli ANA o la soppressione del loro titolo se gli anticorpi che interferiscono hanno un titolo maggiore degli ANA.

Tutte le reazioni del ANA dovrebbero essere segnalate.

Un ANA positivo non dovrebbe essere considerato diagnostico di SLE da sé. Inoltre si presentano in pazienti con altre malattie del tessuto connettivo e determinate droghe quali procainamide ed idralazina possono indurre un ANA positivo¹. Inoltre, i sieri dei pazienti con il cancro e le malattie contagiose possono anche avere ANA positivo²⁰.

Il clinico dovrebbe considerare i risultati di tutte le prove indirette positive di immunofluorescenza con i risultati di altre prove di laboratorio e lo stato clinico del paziente quando fa una diagnosi.

VALORI ATTESI

Come visto in Tables 1, 2, 3, 4 e 5 all'estremità di questo documento, le prove per gli anticorpi nucleari sono usate per selezionare per SLE e determinate altre dispersioni immunologiche. AMA si presentano dentro più di 90% dei casi della cirrosi biliare primaria e di 3-11% dei casi di epatite cronica. ASMA si presentano nella maggior parte dei casi di epatite attiva cronica ed AGPA sono associati comunemente con l'anemia perniciosa e la gastrite atrofica asintomatica.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL METODO

ImmuGlo Kit (rene/stomaco di topo) è stato paragonato ad un'altra prova disponibile in commercio dell'anticorpo fluorescente usando il rene/stomaco di topo. Il confronto incluso: 20 campioni dei sieri positivi del ANA, 19 campioni dei sieri positivi di AMA, 19 campioni dei sieri positivi di ASMA, 20 campioni dei sieri positivi di AGPA e 38 campioni del siero dagli oggetti normali. I sieri erano cominciati esaminati ad una diluizione 1:10 con la procedura suggerita dal fornitore. Questi hanno dato i risultati paragonabili come ricapitolato in Tables 6 e 7 all'estremità di questo documento.



ImmuGlo™ TESTE DE AUTOANTICORPOS

IVD

| | | | |
|------------|---------|---------------------------------------|-------------------|
| REF | 1100 | Fígado de rato | 48 Determinations |
| REF | 1107 | COMVI Rim/estômago de rato | 48 Determinations |
| REF | 1136 | COMVI-III Fígado/rim/estômago de rato | 48 Determinations |
| REF | 1136-96 | COMVI-III Fígado/rim/estômago de rato | 96 Determinations |

Teste de anticorpos de imunofluorescência indirecta para a detecção e quantificação de anticorpos anti-nucleares (ANA) Code: 1100, 1107, 1136, 1136-96, anti-mitocondria (AMA), anticorpos anti-músculo liso (ASMA) e anticorpos anti-células parietal gastric (AGPA) Code: 1107, 1136, 1136-96, no soro humano.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Anticorpos anti-nucleares (ANA) ajudam no diagnóstico de doença do tecido connexivo: o Lupus Eritematoso Sistémico (SLE), doença misturada do tecido connexivo, síndrome de Sjögren e escleroderma¹⁻⁵. ANA ocorrem em aproximadamente 95% de pacientes de SLE e pacientes com outras doenças do tecido connexivo. ANA pode também ocorrer em outras doenças tais como o hepatitis ativo crónico e o PBC⁶⁻⁸.

Anticorpos anti-mitocondria (AMA) ocorrem dentro sobre 90% de casos do cirrhosis biliary preliminares, 3-11% de pacientes ativos hepatitis crónicos e são ausentes nos pacientes com obstrução biliary extra-hepatic e em outras doenças de fígado. A presença de AMA em todos os casos de PBC e na ausência destes anticorpos no jaundice extra-hepatic fá-los úteis em diagnosticar estas doenças⁶⁻¹².

Anticorps anti-muscle lisse (ASMA) no titulação elevado (≥ 160) ocorrem na maioria dos casos do hepatitis ativo crónico e nos titulações intermediários (40-80) no hepatitis de um vírus agudo. Ocasionalmente podem ocorrer nos casos de PBC onde são encontrados também em titulações intermediários. O significado dos titulações de 20-40 é duvidoso desde que estes titulações podem ocorrer em indivíduos normais^{13,14}.

Anticorps anti-cellule pariétale gastrique (AGPA) são associados geralmente com o anemia pernício e o gastritis atrophico crónico onde ocorrem em aproximadamente 90% e em 50% dos casos, respectivamente. Entretanto, não são específico da doença porque podem ocorrer na frequência baixa em outras doenças. Embora os indivíduos saudáveis possam ter AGPA, este que encontra pode refletir o gastritis atrophico sem sintomas. Os testes negativos para AGPA fornecem a evidência forte para excluir o anemia pernício da consideração¹⁵⁻¹⁷.

PRINCÍPIOS DO MÉTODO

No método de imunofluorescência indirecto usado neste kit, o soro dos pacientes é incubado em rim/estômago de rato para permitir a ligação de anticorpos ao substrato. Quaisquer anticorpos livres são removidos através da lavagem da lâmina. Os anticorpos ligados da

classe IgG são detectados através da incubação do substrato com conjugado IgG anti-humano fluoresceínico. As reacções são observadas ao microscópio fluorescente equipado com filtros apropriados. A presença de ANA, ASMA, AMA e AGPA é demonstrada por uma fluorescência verde maçã estruturas histological específicas. A titulação (o recíproca da maior diluição com reacção positiva) é então determinado através da testagem de várias diluições ¹⁸.

INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO

Armazenamento e preparação

Guardar todos os reagentes a 2-8°C. Os reagentes estão prontos a usar após ficarem à temperatura ambiente.

Material fornecido

Materials provided

| | | | | |
|------------|-----------------|---------------------------------------|-------------------|---|
| REF | 1100 | Fígado de rato | 48 Determinations | |
| REF | 1107 | COMVI Rim/estômago de rato | 48 Determinations | |
| REF | 1136 | COMVI-III Fígado/rim/estômago de rato | 48 Determinations | |
| REF | 1136-96 | COMVI-III Fígado/rim/estômago de rato | 96 Determinations | |
| 6 | SORB | SLD | 8 | Lâminas de substrato de 8 poços (1100, 1107, 1136) |
| 12 | SORB | SLD | 8 | Lâminas de substrato de 8 poços (1136-96) |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL | + | ANA * | Controlo positivo ANA, soro humano. |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL | + | AMA * | Controlo positivo AMA, soro humano. |
| 1 x 0.5 ml | CONTROL | - | * | Controlo negativo, soro humano. |
| 1 x 5 ml | IgG-CONJ | FITC | * | Conjugado ITCF IgG anti-humano. Proteger da luz. (1136-96 contem 2 x 5ml) |
| 1 x 5 ml | IgG-CONJ | FITC | EB ** | Conjugado ITCF IgG anti-humano com Evan's Blue. Proteger da luz. (1136-96EB contem 2 x 5ml) |
| 1 x 60 ml | BUF | * | | Diluyente de amostras. |
| 2 frascos | BUF | WASH | | Tampão fosfato alcalino (PBS). Dissolver cada frasco num litro. |
| 1 x 5.0 ml | MOUNTING | MEDIUM | * | Meio de suporte. Não congelar. |
| 1 x 1.0 ml | EVANS | | | Contra corante Azul de Evans. |
| 1 x 12 | COVER | SLD | | Tampas. |

* Contem < 0.1% NaN₃

† Os laços do representante Conjugado sem Azul de Evans em jogo números com "EB"

Material necessário mas não fornecido

Microscópio de fluorescência
 Micropipeta ou pipeta Pasteur
 Pipetas serológicas

Prato de coloração (ex: Coplin)
Tubos pequenos (ex: 13 x 75 mm) e suportes de tubos
Água destilada ou desionizada
Contentor de 1 litro
Garrafa de lavagem
Toalhetes
Câmara de incubação

AVISOS E PRECAUÇÕES

Para o diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes derivados dos humanos utilizados foram testados para HbsAg, VHC, HIV-1 e 2 e HTLV-I e deram negativos nos testes FDA. Todos os espécimens de soro humano e produtos derivados dos humanos devem ser tratados como sendo potencialmente perigosos, independentemente da sua origem. Devem-se respistar as boas práticas laboratoriais na armazenagem, distribuição e manuseamento destes materiais¹⁴.

AVISO: A azida sódica (NaN_3) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação de tais azidas. A azida sódica pode ser tóxica se ingerida. Se ingerida, contacte imediatamente o director de laboratório ou um centro de envenenamento.

As instruções devem ser seguidas à risca de forma a assegurar resultados válidos. Não trocar componentes dos kits com outros de outras origens. Todos devem ser do mesmo nº da IMMCO. Não utilizar se estiverem fora do prazo.

RECOLHA DE AMOSTRAS E PREPARAÇÃO

Só os espécimens séricos devem ser utilizados para este teste. Os espécimens hemolizados, lipémicos ou contaminados microbianamente podem interferir com a performance do teste e não devem ser usados. Armazenar a 2-8°C durante apenas uma semana. Para armazenamento mais longo devem ser congelados a -20°C. Evitar repetidas congelações e descongelações.

MODO OPERATÓRIO

Método do teste

A. Despistagem

1. Diluir cada soro 1:10 (**Code: 1107, 1136, 1136-96**) com o Diluente de amostras fornecido (20 µl soro + 180 µl Diluente) ou 1:20 (Code 1100) (10 µl soro + 190 µl Diluente). Não diluir os Controlos Negativo e Positivo. Guardar o soro não diluído para determinar a titulação de anticorpos, se os testes de despistagem forem positivos.
2. Deixar as bolsas com as lâminas de substrato à temperatura ambiente 10-15 minutos. Retirar as lâminas sem tocar no substrato.
3. Etiquetar as lâminas e colocar na incubadora com toalhetes húmidos para não secarem.
4. Inverter o frasco conta-gotas e apertar para aplicar 1 gota (cerca de 50 µl) de Controlo negativo no poço #1. Coloque 1 gota de Controlo Positivo ANA no poço #2. Se aplicável, Coloque 1 gota de Controlo Positivo AMA no poço #3 (Code: 1107, 1136, 1136-96). Não encher demais.
5. Com uma micropipeta ou pipeta Pasteur, colocar 1 gota do soro diluído do paciente (cerca de 50 µl) nos outros poços. Evite encher demais os poços.
6. Colocar a tampa na incubadora e incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
7. Retirar a lâmina da incubadora. Segurar pela extremidade e lavar com 10 ml de PBS com uma pipeta, ou lavar com recipiente cheio de PBS. Não usar a garrafa de lavagem.

Colocar a lâmina no recipiente Coplin e lavar 10 minutos. Repetir a operação para todas as lâminas.

8. Retirar a lâmina do recipiente Coplin. Limpar as extremidades da lâmina num toallete para retirar o excesso do PBS. Colocar a lâmina na incubadora. Inverter imediatamente o frasco conta-gotas do Conjugado e deitar 1 gota (cerca de 50 µl) em cada poço.
9. Repetir passos 7 e 8 para cada lâmina.
10. Colocar a tampa da incubadora. Incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
11. Retirar uma lâmina da incubadora. Segurar na lâmina e mergulhá-la num recipiente com PBS para remover o excesso de conjugado. Colocar a lâmina num disco de coloração com PBS durante 10 minutos. Pode colocar 2-3 gotas de contracorante azul de Evans à lavagem final. NOTA: Uma lavagem deficiente pode alterar a morfologia dos neutrófilos e levar a um aumento da fluorescência.
12. Retirar a lâmina do prato de coloração. Limpar o excesso de PBS. Para evitar que a lâmina seque deve passar para o ponto 13 enquanto a lâmina ainda está molhada.
13. Colocar a tampa e aplicar 3 gota de Meio de Suporte uniformemente em tampas e colocar a tampa. Não faça muita pressão e evite deslizamento lateral da tampa.
14. Repetir passos 12 e 13
15. Examinar a fluorescência específica com microscópis fluorescente com aumento de 200x ou mais.

As lâminas devem ser lidas quando estão prontas. Contudo, devido à presença de um agente anti-desaparecimento no meio de suporte, não há perdas significativas de intensidade de coloração, se a leitura for adiada até 48 horas. As lâminas devem ser guardadas às escuras a 2-8°C.

B. Determinação (titulação)

Um soro positivo na despistagem pode ser ainda mais testado com os passos 5 ao 13. Para determinar a titulação. Cada teste deve incluir os Controlos Positivo e Negativo. Fazer duas diluições começando com 1:10 (Code: 1107, 1136, 1136-96) or 1:40 (Code: 1100). O recíproco da diluição mais elevada a produzir uma reacção positiva é a titulação.

Preparação de diluições em série

Numerar 4 tubos de 1 a 6. Juntar 1,0 ml de diluente ao tubo 1 e 0,2 ml aos tubos 2 a 4. Pipetar 0,05 ml de soro não diluído para o tubo 1 e mexer bem. Transferir 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e mexer bem. Continuar a transferir 0,2 ml de um tubo para o outro após mexer.

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

CONTROLO DA QUALIDADE

O Controlo Positivo e o Negativo devem ser incluídos em cada teste. O Controlo Negativo não deve ter fluorescência específica do núcleos, músculo liso, tubules do rim ou pilhas parietal gastric, enquanto que o Controlo Positivo AMA deve ter 2+ ou maior intensidade de coloração do tubules do rim e o Controlo Positivo ANA deve ter 2+ ou maior intensidade de coloração do núcleos com um reacção homogêneo.

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

- Turbos. Usar outro controlo.
- Problemas no sistema óptico do microscópio de fluorescência: alinhamento incorrecto, lâmpada a precisar de ser mudada, etc.
- Lâmina seca durante o processo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados dos testes para ANA, AMA, ASMA, e AGPA devem ser relatados como o negativo (< 10) em seções do rim e do estômago (*Code:1107, 1136, 1136-96*), negativo (< 20) em seções do fígado (*Code: 1100*), ou alternativamente, positivo com titulação.

Somente lido campos que contêm manchar específico dos núcleos do rim e as pilhas HEp-2 e o teste padrão observado para ANA, os tubules do rim para AMA, as paredes da embarcação de sangue do rim para ASMA e pilhas parietal gastric somente para AGPA. Todas reações restantes devem ser relatadas como o negativo para ANA, AMA, ASMA e/ ou AGPA.

ANA pode ser detectado em todas as carcaças mas deve ser lido com titulação no rim ou nas pilhas HEp-2. Os testes padrões manchando nucleares visível com a carcaça do rim ou as pilhas HEp-2 fornecida incluem homogêneo, periférico (borda), salpicado e <<nucleolar>>. O centrômero que mancha o teste padrão (isto inclui pilhas no mitosis) é visto o mais facilmente nas pilhas HEp-2. Estes testes padrões manchando nucleares são descritos abaixo. Podem ser um ou uma combinação de diversos testes padrões manchando. O últimos são devido às reações a diversos antígenos nucleares diferentes.

Homogêneo: O núcleo inteiro apresenta fluorescência uniformemente com um teste padrão manchando difuso.

Periférico (borda): A membrana nuclear mancha o mais intensa com intensidade manchando diminuindo do nucleoplasma para o centro do núcleo.

Salpicado: Grosseiros discretos aos salpicos redondos finos apresentam fluorescência durante todo o núcleo.

<<Nucleolar>>: Os nucleoles mancham como corpos contínuos múltiplos dentro do núcleo.

O especificidade de alguns dos anticorpos que dão os testes padrões manchando acima pode mais ser identificado por testes para anticorpos ao nDNA e aos vários ENA. Estes podem ser do significado diagnóstico como listado em FIG 1 na extremidade deste original.

AMA pode ser observado nos tubules do rim. Mesmo que o cytoplasma das pilhas parietal gastric manche também, AMA deve lido com titulação no rim.

Manchar dos muscularis do estômago e dos glomeruli do rim pode também ser observado com ASMA, mas somente ASMA visto nas paredes da embarcação de sangue do rim deve ser relatado.

LIMITAÇÕES DO MODO OPERATÓRIO

Em alguns casos, o soro positivo para ANA pode ser muito fraco ou negativo na diluição inicial da despistagem (fenômeno prozona). Em casos tão duvidosos, o soro deve ser despistado com diluições mais elevadas e, se positivo, a titulação dos anticorpos deve ser determinada.

Em certos casos a presença de dois ou mais anticorpos no soro que são reactivos com o mesmo substrato, podem causar interferência na detecção por imunofluorescência. A interferência pode causar erro na detecção de ANA ou supressão do seu título, se o anticorpos tiver um título mais elevado que o ANA. Todas as reações de ANA devem ser relatadas.

Um ANA positivo não deve ser considerado diagnostic de SLE por se. Ocorrem também nos pacientes com outras doenças do tecido conexivo e determinadas drogas tais como o procainamide e o hydralazine podem induzir um ANA positivo¹. Além disso, os soro dos pacientes com cancer e doenças infectious podem também ter ANA positivo²⁰.

O clínico deve considerar os resultados de todos os testes indiretos positivos do IFA junto com os resultados de outros testes de laboratório e a condição clínica do paciente ao fazer um diagnóstico.

VALORES ESPERADOS

Como visto em Tables 1, 2, 3, 4 e 5 na extremidade deste original, os testes para anticorpos nucleares são usados selecionar para SLE e determinados outros doenças. AMA ocorrem dentro sobre 90% dos casos do cirrhosis biliary preliminares e 3-11% dos casos do hepatitis crônico. ASMA ocorrem na maioria dos casos do hepatitis ativo crônico e AGPA são associados geralmente com o anemia pernição e o gastritis atrophico crônico.

CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE ESPECÍFICA

O ImmuGlo™ Kit (rim/estômago de rato) foi comparado com um outro teste comercialmente disponível do anticorpo fluorescente usando o rim/estômago de rato. A comparação incluída: 20 amostras de soro positivos de ANA, 19 amostras de soro positivos de AMA, 19 amostras de soro positivos de ASMA, 20 amostras de soro positivos de AGPA e 38 amostras do soro dos assuntos normais. Os soro eram começar testada em uma diluição 1:10 com o procedimento recomendado pelo fabricante. Estes renderam resultados comparáveis como sumariados em Tables 6 e 7 na extremidade deste original.

REFERENCES•REFERENCIAS•LITERATUR•RIFERIMENTI

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 33: 167-240, 1982.
2. Kumar V, Beutner EH and Chorzelski TP. Autoimmunity of the skin. In "Concepts in Immunopathology", Vol 1, Cruse JM and Lewis RE Jr, Eds, Karger, Basel, 318-353, 1985.
3. Reimer G, Cornell RC and Tan EM. The biochemical nature of nuclear antigens reactive with antinuclear antibodies. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 519-531, 1987.
4. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Standardization of antinuclear antibody and other immunofluorescent tests used in immunopathologic studies of the skin. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 41-64, 1987.
5. Tan EM, Chan EKL, Sullivan KF and Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): Diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 47: 121-141, 1988.
6. Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A and Meyer zum Büschenfelde KH. Significant autoimmune markers of autoimmune liver disorders: Current status. *J Clin Lab Anal* 1: 362-370, 1987.
7. Mackay IR. Autoimmunity and the liver. *Clin Aspects Immunity* 2: 8- 17, 1988.
8. McMillan SA, Alderdice JM, McKee CM et al. Diversity of autoantibodies in patients with anti-mitochondrial antibody and their diagnostic value. *J Clin Path* 4: 232-236, 1987.
9. Gershwin ME, Coppel RL and Mackay IR. Primary biliary cirrhosis and mitochondrial autoantigens - insights from molecular biology. *Hepatology* 8: 147-151, 1988.
10. Berg PA and Klein R. Mitochondrial antigens and autoantibodies from anti-M1 to anti-M9. *Klin Wochenschr* 64: 897-909, 1986.
11. Popper H and Paronetto F. Clinical, histologic and immunopathologic features of primary biliary cirrhosis. *Springer Semin Immunopathol* 3: 339-354, 1980.
12. Berg PA and Bacon H. Serology of primary biliary cirrhosis. *Springer Semin Immunopathol* 3: 355-373, 1980.
13. Anderson P, Small JV and Sobieszek A. Studies on the specificity of smooth muscle antibodies. *Clin Exp Immunol* 22: 22-29, 1975.
14. Kurki P, Miettinen A, Linder E, Pikkarainen P, Vuorio M and Salaspuro MP. Different types of smooth muscle antibodies in chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis: Their diagnostic and prognostic significance. *Gut* 21: 878-884, 1980.
15. Fisher JB and Taylor KB. The significance of gastric antibodies. *Brit J Haematol* 20: 1-7, 1971.
16. Chisholm M. Immunology of gastritis. *Clin Gastroenterol* 5: 419-428, 1976.
17. Bigazzi PE, Burek CL and Rose NR. Antibodies to tissue-specific endocrine, gastrointestinal and neurological antigens. In "Manual of Clinical Laboratory Immunology". Rose NR, Friedman H and Fahey JL, Eds, American Society for Microbiology, Washington DC, 762-770, 1986.
18. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 3-40, 1987.
19. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1993 [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.

Figure 1. Diagnostic Significance of Antinuclear Antibodies

| IF Staining Pattern | Nature of Antigen | Associated Disease |
|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Homogeneous | Deoxyribonucleoprotein | SLE with renal involvement |
| Peripheral | DNA | SLE |
| Speckled | RNP | SLE or MCTD* |
| | Sm | SLE |
| | SS-A/SS-B | SLE or Sjögren's |
| | Scl-70 | Scleroderma |
| | 4S-6S RNA probably U3 RNA | Scleroderma |

*Mixed Connective Tissue Disease

Table 1: 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 2: Incidence of Antinuclear Antibodies (ANA) Detected by Indirect Immunofluorescence on Mouse Kidney Substrate

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

Table 3: Incidence of Anti-Mitochondrial Antibodies (AMA) Detected by IFA on Mouse Kidney Substrate

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

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

Table 4: Incidence of Anti-Smooth Muscle Antibodies (ASMA) as Detected by IFA on Mouse Kidney Substrate

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

Adapted from Anderson P, et al.¹³

Table 5. Incidence of Anti-Gastric Parietal Cell Antibodies (AGPA) as Detected by Indirect Immunofluorescence on Mouse Stomach Substrate

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

Table 6. Findings in Positive Sera

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

Table 7. Findings in Normal Controls

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



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

For technical assistance please contact:



IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

IMMCO
DIAGNOSTICS

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

E-Mail: info@immcodiagnostics.com

or your local product distributor