



# ImmuGlo™ Anti-Keratin Antibody IFA



**REF** 1122 48 Determinations

## INTENDED USE

An indirect immunofluorescence antibody test for the detection and quantitation of anti-keratin antibodies (AKA) in human serum.

## SUMMARY AND EXPLANATION

Rheumatoid arthritis (RA) is the most prevalent systemic rheumatic disease afflicting 1-2% of the population. It is characterized by mononuclear cell infiltration and proliferation of synovial cells. The disease results in membrane inflammation followed by irreversible degradation of joint cartilage and bone structure. The pathogenesis of RA is unknown, however, it is characterized by the presence of various circulating autoantibodies such as to rheumatoid factor (RF), anti-keratin antibodies (AKA), and anti-perinuclear factor (APF). RF is present in 70-90% of patients with RA and is included in the ARA\* classification criteria.

Anti-keratin antibodies, initially described by Young et al<sup>1</sup>, are found to be highly specific for RA. AKA can be detected by indirect immunofluorescence (IFA) on rat esophagus substrate, even prior to the onset of joint symptoms<sup>2-6</sup>. They occur in approximately 40% of patients with RA, of which approximately 14% are RF negative. The association between RF and AKA is close. Circulating immune complexes are found in significantly higher concentrations in RA patients positive for AKA. This may explain the association of AKA with severe forms of RA.

## PRINCIPLES OF PROCEDURE

In the indirect immunofluorescence method used in this kit, patients' sera are incubated on rat esophagus sections to allow binding of antibodies to the tissue substrate. Any antibodies not bound are removed by rinsing. Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled, anti-human IgG. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of AKA demonstrated by an apple green fluorescence of the stratum corneum of the mucosal epithelium. The titers (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) are then determined by testing serial dilutions.

## PRODUCT INFORMATION

### Storage and preparation

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

### Materials provided

IMMCO Anti-Keratin Antibody IFA **REF** 1122

Kits contain sufficient reagents to perform 48 determinations each.

6 x	<b>SORB</b> <b>SLD</b> <b>8</b>
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>AKA</b> *
1 x 0.5 ml	<b>CONTROL</b> <b>-</b> *

### 8 well Rat Esophagus Slides

**Positive Control.** Contains human serum with BSA.

**Negative Control.** Contains human serum with BSA.

1 x 5 ml **IgG-CONJ** **FITC** \*

1 x 60 ml **BUF** \*

2 vials **BUF** **WASH**

1 x 5.0 ml **MOUNTING MEDIUM** \*

1 x 1.0 ml **EVANS**

1 x 12 **COVER** **SLD**

**Anti-human IgG FITC Conjugate.**  
Contains BSA. **Protect from light.**

**Sample Diluent.** Contains BSA.

**Phosphate Buffered Saline (PBS).**  
Dissolve each vial to 1 liter.

**Mounting Medium.** Do not freeze.

**Evan's Blue Counterstain.**

**Coverslips.** Reconstitute to one liter each.

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

### 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 materials<sup>14</sup>.

WARNING - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

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

### SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

### PROCEDURE

#### Test Method

#### A. Screening

1. Dilute each patient serum 1:10 with the Sample Diluent provided (0.1 ml serum + 0.9 ml 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 0.05 ml) of the Negative Control to well #1. Similarly apply 1 drop of Positive Control to well #2. Avoid overfilling the wells.
5. Using a micropipette or Pasteur Pipette, apply 1 drop of patient's diluted serum (approximately 0.05 ml) 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 0.05 ml) 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. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

### Preparation of Serial Dilutions

Number 6 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
Serum	0.1 ml			
	+			
Buffered Diluent	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↗	↗	↗
Transfer		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Final dilution	1:10	1:20	1:40	1:80 etc.

## **QUALITY CONTROL**

Both a Positive and Negative Control should be included with each test run. The Negative Control should show no specific fluorescence, whereas the Positive Control should have 2+ or greater staining intensity.

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 AKA should be considered negative (< 10), positive (greater or equal to 320), or alternatively, positive with titer.

Read for staining of the stratum corneum layer of the epithelium for AKA, as shown in figure 1 at the end of this document.

## **LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

In some cases, sera positive for AKA 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.

Two or more types of autoantibodies in the serum may react with heart substrate causing interference with their detection and correct identification by immunofluorescence. This results either in the failure to detect AKA antibodies or suppression of their titer, if the interfering antibody has a higher titer.

## **EXPECTED VALUES**

AKA are found in sera from patients with pre-RA and RA. They are rarely detected in non-RA patients.

Specificity:	99%
Sensitivity:	44%
Positive Predictive Value:	43%

The incidence of AKA in relation to RA appears in Table 1 at the end of this document.



# Anticorps Anti-Keratin (AKA) IFA

IVD

REF

1122

48 Déterminations

Un essai indirect d'anticorps d'immunofluorescence pour la détection et le semi-quantification des anticorps du facteur rhumatoïde (RF) en sérum humain.

## SOMMAIRE ET EXPLICATION

Le rhumatisme articulaire (RA) est la maladie rhumatismale systémique la plus répandue, affligeant 1-2% de la population. Il est caractérisé par infiltration de cellules et prolifération mononucléaires des cellules synoviales. La maladie a comme conséquence l'inflammation de membrane suivie de dégradation irréversible de structure commune de cartilage et d'os. La pathogénie du RA est inconnue, cependant, elle est caractérisée par la présence de divers autoanticorps de circulation tels que le facteur rhumatoïde (RF), les anticorps de anti-keratin (AKA), et le facteur anti-perinuclear (APF). Le RF est présent dans 70-90% de RA patients et est inclus dans les critères de classification d'ARA. \*

Les anticorps anti-keratin, au commencement décrits par Young et autres <sup>1</sup>, sont très spécifiques pour le RA. AKA peuvent être détectés par l'immunofluorescence indirecte (IFA) sur le substrat d'oesophage de rat, même avant le début des symptômes communs <sup>2-6</sup>. Ils se produisent dans le ~40% des patients avec du RA, lequel du ~14% sont négatif de RF. L'association entre le RF et l'AKA est étroite. Des complexes immuns de circulation sont trouvés dans des concentrations sensiblement plus élevées dans des patients de RA positifs pour AKA. Ceci peut expliquer l'association d'AKA avec les formes graves de RA.

## PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce coffret, le sérum du patient est incubé sur des substrats de oesophage de rat, 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 réactivités sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. La présence des anticorps de anti-keratin est caractérisée par des réactions du stratum corneum du épithélium muqueux.

## 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

IMMCO Anti-Keratin Antibody IFA

REF 1122

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 48 déterminations chacune.

6 x **SORB|SLD|8**  
1 x 0,5 ml **CONTROL + AKA**  
1 x 0,5 ml **CONTROL -** \*  
1 x 5 ml **IgG-CONJ FITC** \*

**Lames 8 puits de oesophage de rat**  
**Contrôle positif ACM**, sérum humain avec de la BSA  
**Contrôle négatif**, sérum humain avec de la BSA  
**Conjugué FITC anti-IgG** humaines avec de la BSA. Maintenir à l'abri de la lumière

1 x 60 ml **BUF**\*

2 vials **BUF WASH**

1 x 5,0 ml **MOUNTING MEDIUM**\*

1 x 1,0 ml **EVANS**

1 x 12 **COVER SLD**

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

**Diluant sérum**, avec de la BSA

**Tampon phosphate salin (PBS)**. Dissoudre chaque flacon pour obtenir 1 litre

**Milieu de montage**. Ne pas congeler

**Contre colorant Bleu d'Evans**

**Lamelles couvre-lames**

## 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
- Epruvette 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'usage<sup>14</sup>.

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. Éviter les congélations/décongélations successives des sérums.

## MODE OPÉRATOIRE

### A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au 1:10 dans le diluant échantillon fourni (0.1ml de sérum + 0.9 ml 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. Numéroté 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 0.05 ml) de Contrôle Négatif sur le puits #1. De la même façon déposer 1 goutte de Contrôle Positif sur les puits

#2. Eviter de déborder des puits.

5. Avec une micropipette ou une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 0.05 ml) de sérum dilué dans les puits restants. Eviter de déborder des 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 (environ 0.05 ml) 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 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 1:10. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

Préparation des dilutions en série

Numéroter 6 tubes de 1 à 6. Ajouter 0.9 ml de diluant échantillon dans le tube 1 et 0.2 ml dans les tubes 2 à 6. Pipetter 0.1 ml 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:

<b>Tubes</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Sérum</b>	0.1 ml			
	+			
<b>Buffered Diluent</b>	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↻	↻	↻
<b>Transfert</b>		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
<b>Dilution finale</b>	1:10	1:20	1:40	1:80etc.

## 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, tandis qu'avec le contrôle positif on obtient une fluorescence 2+ ou supérieure.

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

### **INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**

Les résultats des essais pour AKA devraient être considérés négatif (< 10), positif (plus grand ou égal à 320), ou alternativement, positif avec le titre.

Lu pour la souillure du stratum corneum de l'épithélium muqueux pour AKA, comme représenté sur le schéma 1 à la fin de ce document.

### **LIMITATIONS DU PROCÉDÉ**

Dans certains cas, les sérums positifs pour les AKA peuvent être très faibles ou négatif à la dilution initiale de criblage (phénomène de prozone). Dans de tels cas douteux les sérums devraient être examinés à des dilutions plus élevées et, si positif, à des titres d'anticorps déterminés.

Deux types ou plus d'autoanticorps dans le sérum peuvent réagir avec le substrat de cœur causant l'interférence avec leur détection et identification correcte par l'immunofluorescence. Ceci a comme conséquence le manque de détecter des anticorps AKA ou la suppression de leur titre, si l'anticorps d'intervention a un titre plus élevé.

### **VALEURS PRÉVUES**

AKA sont trouvés en sérums des patients avec pré du RA et le RA. Ils sont rarement détectés dans non des patients de RA.

Spécificité :	99%
Sensibilité :	44%
Valeur Prédictive Positive :	43%

L'incidence d'AKA par rapport au RA apparaît dans le tableau 1 à la fin de ce document.



# Anticuerpos Anti-Queratina (AKA) IFA



**REF** 1122 48 Determinations

Una prueba inmunofluorescencia indirecta para la detección y la semi-cuantificación de los anticuerpos anti-queratina en el suero humano.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La artritis reumatoide (RA) es la enfermedad reumática sistemática más frecuente, afligiendo 1-2% de la población. Es caracterizada por la infiltración de la célula y la proliferación mononucleares de células sinovial. La enfermedad da lugar a la inflamación de la membrana seguida por la degradación irreversible de la estructura común del cartílago y del hueso. La patogénesis del RA es desconocida, sin embargo, es caracterizada por la presencia de varios autoanticuerpos que circulan tales como factor reumatoide (RF), anticuerpos de la anti-queratina (AKA), y factor anti-perinuclear (APF). El RF está presente en 70-90% de pacientes con RA y se incluye en los criterios de la clasificación de ARA. \*

Los anticuerpos anti-queratina, descritos inicialmente por Young et al<sup>1</sup>, son muy específicos para el RA. AKA se pueden detectar por la inmunofluorescencia indirecta (IFA) en el suero de la rata, uniforme antes del inicio de síntomas comunes<sup>2-6</sup>. Ocurren en el ~40% de pacientes con el RA, de los cuales los ~14% son negativos para el RF. La asociación entre el RF y AKA es cercana. Los complejos inmunes que circulan se encuentran en concentraciones perceptiblemente más altas en los pacientes del RA positivos para AKA. Esto puede explicar la asociación de AKA con las formas severas de RA.

## PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Para la realización del método de inmunofluorescencia indirecta de este equipo tiene que incubarse el suero de los pacientes en preparaciones óptimas de las secciones del tejido 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 los anticuerpos anti-queratina es caracterizada por reacciones del stratum corneum del epitelio mucosidad.

## 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

IMMCO Anti-Keratin Antibody IFA **REF** 1122

El kit contiene los suficientes reactivo para realizar 48 determinaciones.

6 x **SORB | SLD | 8**

**Portaobjetos de 8 pocillos** con sustrato esófago de la rata

1 x 0,5 ml **CONTROL + | AKA**\*

**Control positivo de AKA**, suero humano con BSA

1 x 0,5 ml	<b>CONTROL -</b> *
1 x 5 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>FITC</b> *
1 x 60 ml	<b>BUF</b> *
2 viales	<b>BUF WASH</b>
1 x 5,0 ml	<b>MOUNTING MEDIUM</b> *
1 x 1,0 ml	<b>EVANS</b>
1 x 12	<b>COVER SLD</b>

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

**Control negativo**, suero humano con BSA

**Conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC)-IgG anti humana** con BSA. Proteger de la luz

**Diluyente de la muestra** con BSA

**Fosfato salino tamponado (PBS)**. Disolver cada vial en 1 litro

**Medio de preparación**. No congelar

**Colorante de contraste azul de Evans**

**Cubreobjetos**

### 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 linfotropo 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 material<sup>14</sup>.

**PRECAUCIÓN** - La azida sódica (NaN<sub>3</sub>) 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 el suero de cada paciente con el diluyente de la muestra suministrado (0.1 ml

de suero + 0.9 ml 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 0.05 ml) del Control Negativo en el pocillo nº 1. De forma similar, aplicar una gota del Control Positivo en el pocillo nº 2. 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 0.05 ml) 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 0.05 ml) 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 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 antidesfocamiento, 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 5 - 13, para determinar su titulación. Cada ensayo debe incluir un control positivo y negativo. Realizar diluciones seriadas dobles a partir de 1:10. El título es el valor recíproco de la dilución más elevada que produzca una reacción positiva.

## Preparación de las diluciones seriadas

Numerar 6 tubos del 1 al 6. Añadir 0,9 ml del diluyente de la muestra en el tubo 1 y 0,2 ml en los tubos 2 a 6. Pipetear 0,1 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
Suero	0.1 ml			
	+			
Diluyente tamponado	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		⇩	⇩	⇩
Transferencia		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Dilución final	1:10	1:20	1:40	1:80etc.

## CONTROL DE CALIDAD

En cada serie de ensayos debe incluirse un control positivo y negativo. El control negativo no debe mostrar fluorescencia específica; por el contrario, el control positivo debe tener una intensidad de tinción igual o superior a 2+.

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 AKA se deben considerar negativa (< 10), positivo (mayor o igual a 320), o alternativamente, positivo con título.

Leído para mancharse del stratum corneum del epitelio mucosidad para AKA, según lo demostrado en el cuadro 1 en el extremo de este documento.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En algunas cajas, los sueros positivos para los AKA pueden ser muy débiles o negativa en la dilución inicial de la investigación (fenómeno del prozone). En tales casos dudosos los sueros se deben defender en diluciones más altas y, si positivo, títulos del anticuerpo determinados.

Dos o más tipos de autoanticuerpos en el suero pueden reaccionar con el substrato del corazón que causa interferencia con su detección e identificación correcta por inmunofluorescencia. Esto da lugar a la falta de detectar los AKA o la supresión de su título, si el anticuerpo que interfiere tiene un título más alto.

## VALORES PREVISTOS

AKA se encuentran en sueros de pacientes con pre-RA y RA. Se detectan raramente en no pacientes del RA.

Especificidad :	99%
Sensibilidad:	44%
Valor Profético Positivo:	43%

La incidencia de AKA en lo referente al RA aparece en la tabla 1 en el extremo de este documento.



# Anti-Keratin Antikörper (AKA) IFA

IVD

REF

1122

48 Determinations

Ein indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest für die Abfragung und die Halb-quantitative Bestimmung der Anti-Keratin Antikörper im Humanserum.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Rheumatisch Arthritis (RA) ist die überwiegendste rheumatische körperlichkrankheit und betrifft 1-2% der Bevölkerung. Sie wird durch einkernige Zelle Infiltration und starke Verbreitung der Gelenkschleim-Zellen gekennzeichnet. Die Krankheit ergibt die Membrane Entzündung, die von der irreversiblen Verminderung der gemeinsamen Knorpel- und Knochenstruktur gefolgt wird. Die Pathogenese von RA ist unbekannt, jedoch wird sie durch das Vorhandensein der verschiedenen verteilenden Antikörper wie Rheumatoid Faktor (RF), Anti-Keratin Antikörper (AKA) und Anti-perinuklearer Faktor (APF) gekennzeichnet. Rf ist in 70-90% von Patienten mit RA anwesend und ist in den ARA Klassifikationkriterien. eingeschlossen \*

Die Anti-Keratin Antikörper, zuerst beschrieben von Young et al. <sup>1</sup>, sind für RA AKA können durch indirekte Immunfluoreszenz (IFA) auf dem Ratteösophagussubstrat ermittelt werden sehr spezifisch, das vor dem Angriff der gemeinsamen Symptome <sup>2-6</sup> gleichmäßig ist. Sie treten in ~40% von Patienten mit RA auf, von dem ~14% Rf Negativ sind. Die Verbindung zwischen Rf und AKA ist nah. Verteilende immune Komplexe werden in den erheblich höheren Konzentrationen bei den RA-Patienten gefunden, die für AKA positiv sind. Dieses kann die Verbindung von AKA mit strengen Formen von RA erklären.

## TESTPRINZIP

Bei dem in diesem Test eingesetzten indirekten Immunfluoreszenzverfahren werden Patientenseren mit optimierte Vorbereitungen der Gewebeabschnitte inkubiert, um die Bindung von in den Seren vorhandenen Autoantikörpern zu ermöglichen. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Gebundene Antikörper vom Typ IgG werden durch Inkubation mit Fluorescein-markiertem anti-Human-IgG nachgewiesen. Das Reaktionsmuster wird unter einem Fluoreszenzmikroskop bewertet, das mit den entsprechenden Filtern ausgerüstet ist. Das Vorhandensein der Anti-Keratin Antikörper wird durch die feinfaserigen, der stratum corneum der Schleim-Epithel Reaktionen gekennzeichnet.

## 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

IMMCO Anti-Keratin Antibody IFA

REF

1122

Installationssätze enthalten genügende Reagenzien, um 48 Ermittlungen jede durchzuführen.

6 x

SORB SLD 8

Objektträger zu 8 Auftragsstellen  
beschichtet mit Rattenspeiseröhre

1 x 0.5 ml

CONTROL + AKA\*

AKA Positive Kontrolle,  
Humanserum mit BSA

1 x 0.5 ml **CONTROL -** \*

1 x 5 ml **IgG-CONJ FITC** \*

1 x 60 ml **BUF** \*

2 vials **BUF WASH**

1 x 5.0 ml **MOUNTING MEDIUM** \*

1 x 1.0 ml **EVANS**

1 x 12 **COVER SLD**

\* enthält < 0.1% NaN<sub>3</sub>

**Negative Kontrolle**, Humanserum mit BSA

**FITC-Konjugat, Anti-Human-IgG** mit BSA. Lichtgeschützt aufbewahren

**Probendiluent** mit BSA

**Phosphatgepuffertes Kochsalz (PBS)**. Inhalt eines Fläschchens in 1 Liter auflösen

**Eindeckmittel**. Nicht einfrieren

**Evans Blau Färbemittel**

**Deckgläschen**

### 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 beseitigen<sup>14</sup>.

**ACHTUNG** - Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) 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 Probendiluent aus dem Kit 1:10 (0.1 ml Serum + 0.9 ml Diluent) verdünnen. 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).

- Objekträger vorsichtig entnehmen, ohne die Beschichtung zu berühren.
3. Objekträger beschriften und, um ein Austrocknen der Beschichtung zu verhindern, in eine feuchte Kammer legen.
  4. Von den Tropffläschchen mit der Negativen und Positiven Kontrolle jeweils 1 Tropfen (etwa 0.05 ml) auf die Auftragstellen #1 bzw. #2 ausdrücken. Auftragstellen nicht überfüllen.
  5. Mit einer Mikro- oder Pasteurpipette 1 Tropfen verdünntes Patientenserum (etwa 0.05 ml) auf die weiteren Auftragstellen geben. Auftragstellen nicht überfüllen.
  6. Die Objekträger in der abgedeckten feuchten Kammer 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
  7. Jeweils einen Objekträger aus der feuchten Kammer nehmen. Am beschrifteten Ende anfassen und sorgfältig mit ca. 10 ml PBS aus einer Pipette spülen; alternativ Objekträger in einem Becher mit PBS spülen. Keine Spritzflasche verwenden. Objekträger sofort in einen Färbetrog mit PBS für 10 Minuten stellen. Mit den anderen Objekträgern ebenso verfahren.
  8. Objekträger einzeln aus dem Färbetrog nehmen. Längsseite des Objekträgers gegen ein Papiertuch halten, um Überschuß an PBS zu entfernen. Objekträger in die feuchte Kammer legen und sofort vom Tropffläschchen mit Konjugat 1 Tropfen (etwa 0.05 ml) auf jede Auftragstelle ausdrücken.
  9. Die Schritte 7 und 8 mit jedem Objekträger einzeln durchführen.
  10. Feuchte Kammer abdecken und Objekträger 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
  11. Jeweils einen Objekträger aus der feuchten Kammer nehmen. Am beschrifteten Ende anfassen und in einen Becher mit PBS eintauchen, um Überschuß an Konjugat zu entfernen. Objekträger 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 Objekträgern ebenso verfahren. HINWEIS: Unsachgemäßes Waschen kann die Morphologie beeinträchtigen und eine erhöhte Hintergrundfluoreszenz bewirken.
  12. Objekträger einzeln aus dem Färbetrog nehmen. Längsseite des Objekträgers 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 Objekträger einzeln durchführen.
  15. Auf spezifische Fluoreszenz hin unter einem Fluoreszenzmikroskop bei mindestens 200facher Vergrößerung auswerten.

Die Objekträger können sofort nachdem sie angefertigt wurden ausgewertet werden. Weil das Eindeckmittel einen Stoff enthält, der einem Ausbleichen entgegenwirkt, können die Objekträger jedoch bis 48 Std. später ausgewertet werden, ohne daß die Intensität der Fluoreszenz signifikant abklingt. Die Objekträger 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-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**

6 Röhrrchen mit 1 bis 6 beschriften. Vom Probendiluent 0.9 ml in Röhrrchen 1 und jeweils 0.2 ml in Röhrrchen 2 bis 6 geben. 0.1 ml unverdünntes Serum in Röhrrchen 1 pipettieren und gründlich durchmischen. Aus Röhrrchen 1 0.2 ml ins Röhrrchen 2 überführen und gründlich durchmischen. Die Verdünnungsreihe wie in der folgenden Tabelle dargestellt fortführen, indem nach

Durchmischen jeweils 0.2 ml von einem Röhrchen in das nächste überführt werden.

Röhrchen	1	2	3	4
Serum	0.1 ml			
	+			
Probendiluent	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↗	↗	↗
Zu überführen		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Endverdünnung	1:10	1:20	1:40	1:80etc.

### QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Testlauf sollten sowohl eine positive wie eine negative Kontrolle mitgeführt werden. Die negative Kontrolle sollte keine spezifische Fluoreszenz zeigen. Die positive Kontrolle sollte eine Fluoreszenzintensität von mindestens 2+ zeigen.

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

Testergebnisse für AKA sollten gelesenes negatives (< 10) oder Positiv mit Titer sein. Gelesen für das Beflecken der stratum corneum des Schleim-Epithels für AKA, wie in Tabelle 1 am Ende dieses Dokumentes gezeigt.

### BESCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

In einigen Fällen können die Seren, die für AKA positiv sind, entweder sehr schwach oder Negativ an der Ausgangssiebungsverdünnung (Prozone Phänomen) sein. In solchen zweifelhaften Fällen sollten die Seren an den höheren Verdünnungen und, wenn Positiv, an den festgestellten worden Antikörpertitern aussortiert werden.

Zwei oder mehr Arten Autoantikörper im Serum können mit dem Herzsubstrat reagieren, das Störung mit ihrer Abfragung und korrekten Kennzeichnung durch Immunofluoreszenz verursacht. Dieses ergibt entweder die Störung, AKA oder Ausgleich ihres Titers zu ermitteln, wenn der behindernde Antikörper einen höheren Titer hat.

### ERWARTETE WERTE

AKA werden in den Seren von den Patienten mit vor RA und RA gefunden. Sie werden selten bei nicht RA- Patienten ermittelt.

Besonderheit :	99%
Empfindlichkeit:	44%
Positiver Vorbestimmter Wert:	43%

Die Ausdehnung von AKA in bezug auf ein RA erscheint in Tabelle 1 am Ende dieses Dokumentes.



# Anticorpi Anti-Cheratina (AKA) IFA

IVD

REF

1122

48 Determinations

Una provadi immunofluorescenza indiretta per la rilevazione e la semi-quantificazione degli anticorpi anti-cheratina in siero umano.

## SOMMARIO E SPIEGAZIONE

L'artrite reumatoide (RA) è la malattia reumatica sistemica più prevalente, affliggente 1-2% della popolazione. È caratterizzata tramite infiltrazione delle cellule e proliferazione mononucleari delle cellule sinoviale. La malattia provoca l'infiammazione della membrana seguita da degradazione irreversibile della struttura unita dell'osso e della cartilagine. La patogenesi di RA è sconosciuta, tuttavia, è caratterizzata dalla presenza di vari autoanticorpi circolanti quali il fattore reumatoide (RF), gli anticorpi della anti-cheratina (AKA) ed il fattore anti-perinucleare (APF). La RF è presente in 70-90% dei pazienti con RA ed è inclusa nei test di verifica di classificazione di ARA. \*

Gli anticorpi della anti-cheratina, inizialmente descritti da Young ed altri <sup>1</sup>, sono molto specifici per RA. AKA possono essere rilevati dall'immunofluorescenza indiretta (IFA) sul substrato dell'esofago del ratto, anche prima dell'inizio dei sintomi uniti <sup>2-6</sup>. Si presentano in ~40% dei pazienti con RA, di cui ~14% sono negazione di RF.

L'associazione fra la RF ed AKA è vicina. I complessi immuni circolanti sono trovati nelle concentrazioni significativamente più alte nei pazienti del RA positivi per AKA. Ciò può spiegare l'associazione di AKA con le forme severe di RA.

## PRINCIPIO DEL METODO

Nella metodica in immunofluorescenza indiretta utilizzata in questo kit, i sieri dei pazienti vengono incubati su preparazioni ottimizzate delle sezioni del tessuto 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. La presenza degli anticorpi del anti-cheratina è caratterizzata dalle reazioni **del stratum corneum dell'epitelio mucoso**.

## 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

IMMCO Anti-Keratin Antibody IFA REF 1122

I corredi contengono i reagenti sufficienti per realizzare 48 determinazioni ciascuno.

6 x	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">SORB</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">SLD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">8</span>	<b>Vetrini-substrato di esofago de ratto con 8 pozzetti</b>
1 x 0,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">+</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">AKA</span> *	<b>Controllo positivo AKA</b> , siero umano con BSA
1 x 0,5 ml	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">-</span> *	<b>Controllo negativo</b> , siero umano con BSA

1 x 5 ml     **IgG-CONJ FITC** \*

1 x 60 ml     **BUF** \*

2 flaconcini   **BUF WASH**

1 x 5,0 ml     **MOUNTING MEDIUM** \*

1 x 1,0 ml     **EVANS**

1 x 12         **COVER SLD**

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

**Coniugato FITC anti-IgG umana** con BSA. Tenere lontano dalla luce.

**Diluyente per campioni** con BSA

**Tampone fosfato-salino (PBS)**. Ricostituire ciascun flaconcino con 1 litro d'acqua

**Mezzo Montante**. Non congelare.

**Blu di Evans**

**Vetrini coprioggetto**

## 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 materiali<sup>14</sup>. **ATTENZIONE** - La sodio azide (NaN<sub>3</sub>) 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 con il Diluyente per Campioni fornito (0.1 ml di siero + 0.9 ml di Diluyente). **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 0.05 ml) del Controllo Negativo nel pozzetto no. 1. Allo stesso modo versare 1 goccia del Controllo Positivo nel pozzetto no. 2, evitando di riempire eccessivamente i pozzetti.

5. Con una micropipetta o con la pipetta Pasteur, versare 1 goccia del siero diluito del paziente (circa 0.05 ml) 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 0.05 ml) 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 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 1:10. Il reciproco della diluizione più elevata che produce una reazione positiva è il titolo.

### Preparazione delle Diluizioni Seriali

Numerare 6 provette da 1 a 6. Aggiungere 0,9 ml di Diluente per Campioni alla provetta 1 e 0,2 ml alle provette da 2 a 6. Pipettare 0,1 ml di siero non diluito nella provetta 1 e 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
Siero	0.1 ml			
	+			
Diluente tamponato	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		↕	↕	↕
Trasferimento		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Diluizione finale	1:10	1:20	1:40	1:80etc.

## **CONTROLLO DI QUALITA'**

Ciascuna sessione analitica deve comprendere sia un Controllo Positivo che uno Negativo. Il Controllo Negativo non deve mostrare alcuna fluorescenza specifica, mentre il Controllo Positivo deve avere un'intensità di colorazione di almeno 2+ con il controllo positivo.

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 AKA dovrebbero essere considerati negazione (< 10), positivo (più grande o uguale a 320), o alternativamente, positivo con il titolo.

Colto per la macchiatura dello stratum corneum dell'epitelio per AKA, come appare figura 1 all'estremità di questo documento.

## **LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**

In alcuni casi, i sieri positivi per gli AKA possono essere molto deboli o negazione alla diluzione iniziale della selezione (fenomeno di prozone). In tali casi dubbiosi i sieri dovrebbero essere selezionati alle più alte diluzioni e, se positivo, ai titoli dell'anticorpo determinati.

Due o il più tipi di autoanticorpi nel siero possono reagire con il substrato del cuore che causa l'interferenza con la loro rilevazione ed identificazione corretta dall'immunofluorescenza. Ciò provoca l'omissione di rilevare gli AKA o la soppressione del loro titolo, se l'anticorpo interferente ha un più alto titolo.

## **VALORI PREVISTI**

AKA sono trovati in sieri dai pazienti con pre RA e RA. Sono rilevati raramente non nei pazienti del RA.

Specificità :	99%
Sensibilità:	44%
Valore di previsione Positivo:	43%

L'incidenza di AKA rispetto a RA compare in tabella 1 all'estremità di questo documento.



# Anticorpos Anti-Keratin (AKA) IFA

IVD

REF

1122

48 Determinations

Um teste imunofluorescência indireto do para a detecção e o semi-quantitação de anticorpos anti-keratin no soro humano.

## SUMÁRIO E EXPLANAÇÃO

O artrite reumático (RA) é a doença reumática sistemática mais prevalente, afligir 1-2% da população. É caracterizado pela infiltração da pilha e pelo proliferação mononuclear de pilhas sinovial. A doença resulta na infiltração da membrana seguido pela degradação irreversível da estrutura comum do cartilagem do osso. O origem da doença do RA é desconhecido, entretanto, é caracterizado pela presença de vários autoanticorpos circulando tais como o fator reumático (RF), os anticorpos do anti-keratin (AKA), e o fator anti-perinuclear (APF). O RF está atual em 70-90% dos pacientes com RA e é incluído nos critérios da classificação de ARA. \*

Os anticorpos do anti-keratin, descritos inicialmente por Novo et al <sup>1</sup>, são muito específicos para o RA. AKA podem ser detectados pelo imunofluorescência indireto (IFA) na carcaça do esôfago do rato, uniforme antes do início de sintomas comuns <sup>2-6</sup>. Ocorrem em ~40% dos pacientes com RA, de que ~14% são negativo do RF. A associação entre o RF e o AKA é próxima. Os complexos imunes circulando são encontrados em umas concentrações significativamente mais elevadas nos pacientes do RA positivos para AKA. Isto pode explicar a associação de AKA com formulários severos do RA.

## PRINCÍPIOS DO MÉTODO

No método de imunofluorescência indirecto usado neste kit, o soro dos pacientes é incubado em preparações optimizadas de seções do tecido 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 anticorpos do anti-coração é caracterizada por reacções do stratum corneum do epitélio mucosa.

## 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

IMMCO Anti-Keratin Anticorpos IFA **REF** 1122

Os jogos contêm reagentes suficientes para executar 48 determinações cada uma.

6 x **SORB** **SLD** **8**

**Lâminas de substrato esôfago do rato de 8 poços**

1 x 0,5 ml **CONTROL** **+** **AKA** \*

**Controlo positivo AKA**, soro humano com BSA.

1 x 0,5 ml **CONTROL** **-** \*

**Controlo negativo**, soro humano com BSA.

1 x 5 ml **IgG-CONJ FITC** \*

1 x 60 ml **BUF** \*

2 vials **BUF WASH**

1 x 5,0 ml **MOUNTING MEDIUM** \*

1 x 1,0 ml **EVANS**

1 x 12 **COVER SLD**

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

**Conjugado ITCF IgG** anti-humano com BSA. **Proteger da luz.**

**Diluyente de amostras** com BSA

**Tampão fosfato alcalino** (PBS). Dissolver cada frasco num litro.

**Meio de suporte.** Não congelar.

**Contra corante Azul de Evans.**

**Tampas**

## 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 materiais<sup>14</sup>.

AVISO: A azida sódica (NaN<sub>3</sub>) 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 com o Diluyente de amostras fornecido (0.1 ml soro + 0.9 ml Diluyente). 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 0.05 ml) de*

Controlo negativo no poço #1. Coloque 1 gota de Controlo Positivo no poço #2. Não encher demais.

5. Com uma micropipeta ou pipeta Pasteur, colocar 1 gota do soro diluído do paciente (cerca de 0.05 ml) 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 toalhete 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 0.05 ml) 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 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. O recíproco da diluição mais elevada a produzir uma reacção positiva é a titulação.

### Preparação de diluições em série

Numerar 6 tubos de 1 a 6. Juntar 0,9 ml de diluente ao tubo 1 e 0,2 ml aos tubos 2 a 6. Pipetar 0,1 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
Soro	0.1 ml			
	+			
Diluente tamponado	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
		⇩	⇩	⇩
Transferência		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Diluição final	1:10	1:20	1:40	1:80etc.

### CONTROLO DA QUALIDADE

O Controlo Positivo e o Negativo devem ser incluídos em cada teste. O Controlo Negativo não deve ter fluorescência específica, enquanto que o Controlo Positivo deve ter 2+ ou maior intensidade.

Se não se obtiverem os resultados esperados, o teste deve ser repetido. Se resultados inadequados continuarem a ocorrer com os controlos, pode deverse 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 AKA devem ser considerados negativo (< 10), positivo (mais grande ou igual a 320), ou alternativamente, positivo com titulação.

Lido para manchar da stratum corneum do epitélio para AKA, como mostrado em figura 1 na extremidade deste original.

### **LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**

Em algumas caixas, os soro positivos para AKA podem ser muito fracos ou negativo na diluição inicial da seleção (fenômeno do prozone). Em tais casos duvidosos os soro devem ser seleccionados em umas diluições mais elevadas e, se positivo, em titulações do anticorpos determinados.

Dois ou o mais tipos de autoanticorpos no soro podem reagir com a carcaça do coração que causa a interferência com suas detecção e identificação correta pelo imunofluorescência. Isto resulta na falha detectar AKA ou supressão de seu titulação, se o anticorpo interferindo tiver um titulação mais elevado.

### **VALORES PREVISTOS**

AKA são encontrados nos soro dos pacientes com pre-RA e RA. São detectados raramente non- em pacientes do RA.

Especificação:	99%
Sensibilidade:	44%
Valor Profético Positivo:	43%

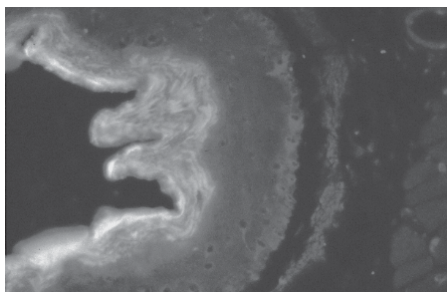
A incidência de AKA com relação ao RA aparece na tabela 1 na extremidade deste original.

## REFERENCES•REFERENCIAS•LITERATUR•RIFERIMENTI

1. Young BJJ, Mallya RK, Leslie RDG, Clark CJM, Hamblin TJ. Antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J*; 1979, ii:97-99.
2. Aho K, von Essen R, Kurki P, Paluso T, Heliövaara M. Antikeratin antibody and antiperinuclear factor as markers for subclinical rheumatoid disease process. *J Rheumatol*; 1993, 20:1278-1281.
3. Kurki P, Aho K, Paluso T, Heliövaara M. Immunopathology of rheumatoid arthritis. Antikeratin antibodies precede the clinical disease. *Arthr Rheum*; 1992, 35:914-917.
4. Paimela L, Gripenberg M, Kurki P, Leirisalo-Repo M. Antikeratin antibodies: diagnostic and prognostic markers for early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*; 1992, 51:743-746.
5. von Essen R, Kurki P, Isomäki H, Okubo S, Kautiainen H, Aho K. Prospect for an additional laboratory criterion for rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*; 1993, 22:267-272.
6. Vincent C, Serre G, Lapeyre F, Fournié B, Ayrolles C, Fournié A, Soleilhavoup J. High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat oesophagus epithelium, so-called 'antikeratin antibodies'. *Ann Rheum Diseases*; 1989, 48:712-722.
7. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1993 [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395].



**Figure 1: AKA Positive Reaction**



**Table 1: AKA and RF in Patients With Peripheral Oligo/Polyarthritis in Relation to ARA\* Criteria for RA**

AKA	≥ 4 Criteria		3 Criteria		< 3 Criteria	
	RF+	RF-	RF+	RF-	RF+	RF-
<b>Positive</b>	27%	4%	18%	9%	4%	0%
<b>Negative</b>	44%	23%	18%	54%	12%	84%

Scand J Rheumatol; 1993, 22:267-272.

\*American Rheumatology Association

*For technical assistance please contact:*



**IMMCO**<sup>®</sup>  
DIAGNOSTICS

**IMMCO Diagnostics, Inc.**

**60 Pineview Drive**

**Buffalo, NY 14228-2120**

**Telephone: (716) 691-0091**

**Fax: (716) 691-0466**

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

**E-Mail: [info@immcodiagnostics.com](mailto:info@immcodiagnostics.com)**

*or your local product distributor*



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

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,

The Netherlands

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

[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)