



HEp-2 / DFS70 Knock-out IFA

PRODUCT INSERT

IVD

| | | | |
|------------|----------|-------------------------------------|--------------------|
| REF | 1108 | HEp-2/DFS70 Knock-out Substrate Kit | 60 Determinations |
| REF | 1108-120 | HEp-2/DFS70 Knock-out Substrate Kit | 120 Determinations |
| REF | 1108-240 | HEp-2/DFS70 Knock-out Substrate Kit | 240 Determinations |

INTENDED USE

Indirect immunofluorescence (IF) antibody test for the detection and quantitation of anti-nuclear antibodies (ANA) 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-hepaticjaundice 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-DFS70 Antibodies produce a nuclear dense fine speckled immunofluorescence pattern (DSF70) on HEp-2 cells. These autoantibodies target a 70 kDa antigen also known as LEDGF (Lens Epithelium Derived Growth Factor) or psip1 gene product. These have been initially reported to occur in sera from patients with positive ANA tests but no clinical evidence of systemic autoimmune rheumatic disease (SARD). Their presence was initially documented in patients with certain inflammatory conditions and 'apparently' healthy individuals¹⁵⁻¹⁷. DFS70 antibodies produce a pattern that can be confused as homogeneous (associated with DNA, histones and nucleosomes) or fine speckled pattern associated with SARDs. On the slides provided with this kit, standard HEp-2 (HEP2) are mixed with HEp-2 with the psip1 gene knocked out (eHEP2) in 1:9 ratio. Non-engineered HEP2 detect all autoantibody specificities. eHEP2 cells are able to detect all autoantibody specificities except DFS70 associated with psip1/LEDGF. The use of this product thereby provides additional functionality to discriminate homogeneous, speckled and dense fine speckled patterns. This may provide the laboratory with more information to select appropriate confirmatory assays.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

In the indirect IF method used in this kit, patient sera are incubated on HEp-2 cell substrates to allow binding of antibodies. 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 conjugate. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of ANA, ASMA, and AMA is demonstrated by an apple green fluorescence of specific structures in the cells. A majority of the cells present have the psip1 gene knocked out which prevents formation of LEDGF binding sites in these cells. This allows differentiation of ANA homogeneous and speckled reaction patterns from DSF70 patterns¹⁸. The titers (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) are then determined by testing serial dilutions¹⁹.

PRODUCT INFORMATION

Storage and preparation

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

Materials provided

EN

HEp-2/DFS70 Knock-out Substrate Kit

| | | |
|----------------------------|----------------------|--|
| [REF] 1108 | 60 Determinations | |
| [REF] 1108-120 | 120 Determinations | |
| [REF] 1108-240 | 240 Determinations | |
| HEp-2 substrate | [SORB SLD 12] | Barcoded 12 well HEp-2/DFS70 knock out substrate slide (5x [REF] 1108, 10x [REF] 1108-120, 20x [REF] 1108-240) |
| 1 x 0.5 ml | [CONTROL + ANA-HOMO] | ANA positive control. Contains human serum. |
| 1 x 0.5 ml | [CONTROL + DFS70] | DFS70 antibody positive control. Contains human serum. |
| 1 x 0.5 ml | [CONTROL -] | Negative control. Contains human serum. |
| 5 ml | [IgG-CONJ FITC EB] | Anti-human IgG FITC conjugate containing Evan's blue counterstain. Protect from light. (1x [REF] 1108, 2x [REF] 1108-120, 3x [REF] 1108-240) |
| 60 ml | [BUF] | Buffered diluent. (1x [REF] 1108, 1108-120, 2x [REF] 1108-240) |
| vials | [BUF WASH] | Phosphate buffered saline (PBS). Dissolve each vial into 1L distilled or deionized water. (2x [REF] 1108, 1108-120, 3x [REF] 1108-240) |
| 5 ml | [MOUNTING MEDIUM] | Mounting medium. Do not freeze. (1x [REF] 1108, 1108-120, 2x [REF] 1108-240) |
| 12 per box | [COVER SLD] | Coverslips. (1x [REF] 1108, 2x [REF] 1108-120, 4x [REF] 1108-240) |
| Optional Components | | |
| 5 ml | [IgG-CONJ FITC] | Anti-human IgG FITC conjugate. Protect from light. [REF] 2100x |
| 1 ml | [EVANS] | Evan's blue counterstain. [REF] 2510*. |

Symbols used on labels:

| | |
|-------|------------------------------|
| [LOT] | Lot number |
| [REF] | Catalog number |
| [IVD] | In vitro diagnostic use |
| [U] | Use by |
| [T] | Storage temperature |
| [C] | Consult instructions for use |
| [N] | Number of tests |
| [M] | Manufacturer |
| [D] | Date of Manufacture |

 * Danger. May cause cancer. Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection. Store locked up. Dispose of contents/container to comply with local, state and federal regulations.

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
- 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-1 and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regard-less of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials²⁰.

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 Diagnostics Inc. Do not use beyond expiration date.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

PROCEDURE

Test Method

A. Screening

Patient sera to be reacted on slides with HEp-2 substrate should be diluted using 1:40 screening dilution. On HEp-2 a specific reaction at 1:40 or greater titer is considered positive.

1. Dilute each patient serum 1:40 (10 μl serum + 390 μl diluent). Do not dilute Positive or Negative Controls. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
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. 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 μl) to each well.
9. Repeat steps **7 and 8** for each slide.
10. Replace the lid on the incubation chamber. Incubate 30 minutes at room temperature.
11. Remove a slide from incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for 10 minutes. If optional conjugate without counterstain is used (see optional components in Materials Provided Section), 2-3 drops of Evan's Blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides. NOTE: Improper washing may lead to increased background fluorescence.
12. Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. **To prevent slide from drying, proceed immediately with next step while slide is still wet.**
13. Mount the coverslip by applying **3 drops** of Mounting Medium evenly on the coverslip and place coverslip over slide. Avoid applying undue pressure and prevent lateral movement of the coverslip.
14. Repeat steps 12 and 13 for each slide.
15. Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater.

EN

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 appropriate screening dilution for the substrate. Each test run should include the Positive and Negative Controls. Make serial two-fold dilutions starting at 1:40. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

Preparation of Serial Dilutions Starting at 1:40

To create serial dilutions of a patient sample from 1:40 to 1:1280, begin by numbering six tubes from 1 through 6. More tubes may be used if a higher final dilution is desired. Add 3.9 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 | 3.9 ml | 0.2 ml |
| | Ճ | Ճ | Ճ | Ճ | Ճ | Ճ |
| Transfer | | 0.2 ml |
| Final dilution | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 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. The ANA Positive Control should have 2+ or greater staining intensity of the nuclei 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

Results should be reported as negative, positive, or, if end-point titer has been determined, positive with titer. It is recommended that patient samples demonstrating specific fluorescence reactions at a dilution of 1:40 be reported as positive. This should serve as a guide in the interpretation of results. Each laboratory must determine its own normal values to account for differences in microscopy systems, personnel and training.

Read only fields which contain specific staining of the HEp-2 cells and the patterns observed for ANA, AMA and ASMA. All other reactions should be reported as negative.

ANA can be quantified on the HEp-2 cells. The nuclear staining patterns observable include homogeneous, peripheral (rim), speckled, nucleolar and centromere. These nuclear staining patterns are described below. They may be one or a combination of several staining patterns. The latter are due to reactions to several different nuclear antigens.

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

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

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

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

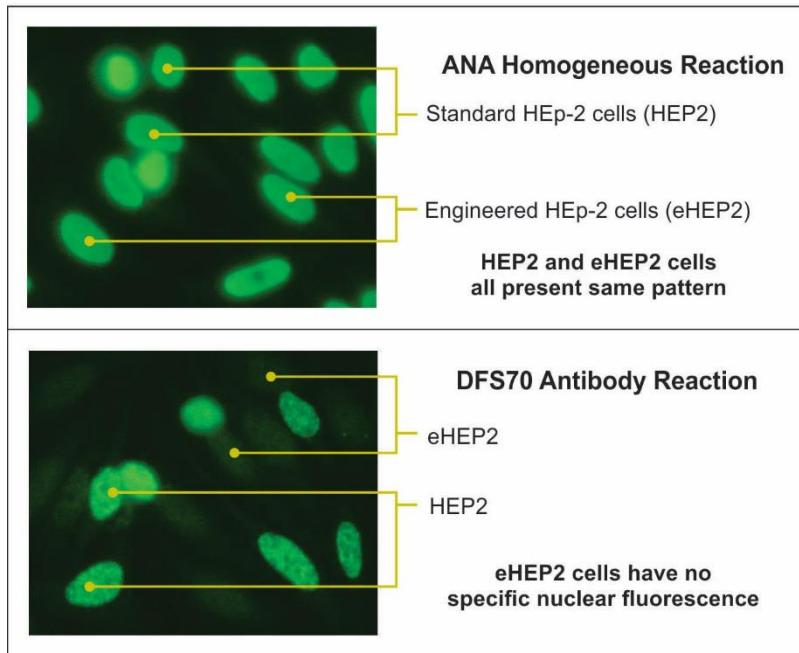
Centromere: Large speckles of finite number. Reactive antigen segregates with condensed chromosomes in cells undergoing mitosis⁵.

DFS70: Standard HEp-2 (HEP2): In ~10% of the cells in each well, a dense fine speckled pattern will be observed on the interphase nucleus. Chromatin associated staining is seen on mitotic nuclei.

Engineered HEp-2 (eHEP2): The remaining ~90% of HEp-2 cells have the psip1 gene encoding the

LEDGF antigen knocked out and therefore will not produce a similar pattern. If 10% of the HEp-2 cells have brighter fluorescence corresponding to DFS70 pattern and rest of the cells present additional patterns or fine speckled signal above cut-off, it indicates the presence of mixed patterns. Closer analysis of such patterns is essential to confirm what other antibody specificity is present in addition to the DFS70 pattern associated with LEDGF/psip1.

Figure 1. Reference Reactions



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

Table 1. Diagnostic Significance of Antinuclear Antibodies

| IF Staining Pattern | Nature of Antigen | Associated Disease |
|------------------------|---|---|
| Homogeneous | dsDNA/Histones | SLE |
| Nuclear membranous | Laminins | SLE, vasculitis or chronic hepatitis |
| Speckled | RNP | SLE or MCTD* |
| | Sm | SLE |
| | SS-A/SS-B | SLE or Sjögren's Syndrome |
| | Scl-70 | Scleroderma |
| Nucleolar | RNAP-I | Scleroderma |
| | Pm-Scl | |
| | RNA/probably U3 RNA | |
| Centromere/Kinetochore | inner and outer plates of kinetochore | CREST syndrome |
| DFS70 ¹⁵⁻¹⁸ | Dense Fine Speckled Pattern (positive in ~10% of cells or relatively higher fluorescence signal in ~10% of cells) | Negative association with systemic autoimmune diseases; reported in atopic dermatitis, alopecia aerata, Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) disease, sympathetic ophthalmia, Behcet's disease and atypical retinal degeneration. |

* Mixed Connective Tissue Disease

EN

Detectable cytoplasmic antibodies include anti-mitochondrial antibodies (AMA) and anti-smooth muscle antibodies (ASMA). In an AMA pattern, the cytoplasm appears granular, whereas the ASMA pattern is a fibrillar network of staining throughout the cytoplasm. Both patterns should be reported as negative for ANA.

LIMITATION OF THE PROCEDURE

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

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

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

A positive ANA should not be considered diagnostic of SLE by itself. They also occur in patients with other connective tissue diseases and certain drugs such as procainamide and hydralazine may induce a positive ANA¹. Moreover, sera of patients with malignancies and infectious diseases may also have positive ANA²¹.

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

EXPECTED VALUES

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.

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

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

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

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

HEp-2 / DFS70 Αδρανοποιημένα IFA

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

| | |
|------------|---|
| IVD | |
| REF | 1108 Κιτ υποστρώματος HEp-2/DFS70 αδρανοποιημένων 60 προσδιορισμοί |
| REF | 1108-120 Κιτ υποστρώματος HEp-2/DFS70 αδρανοποιημένων 120 προσδιορισμοί |
| REF | 1108-240 Κιτ υποστρώματος HEp-2/DFS70 αδρανοποιημένων 240 προσδιορισμοί |

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Εξέταση αντισωμάτων με έμμεσο ανοσοφθορισμό (IF) για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) στον ανθρώπινο ορό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

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

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

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

Τα **αντι-DFS70 αντισώματα** παράγουν πυκνό λεπτό στικτό πρότυπο ανοσοφθορισμού (DSF70) στον πυρήνα των κυττάρων HEp-2. Αυτά τα αυτοαντισώματα στοχεύουν ένα αντιγόνο μεγέθους 70 kDa που είναι γνωστό και ως LEDGF (αυξητικός παράγοντας του επιθηλίου του φακού) ή παράγωγο του γονιδίου psip1. Αρχικά αναφέρθηκε ότι αυτά τα αυτοαντισώματα απαντούν στον ορό ασθενών με θετικές εξετάσεις για ANA αλλά χωρίς κλινικές ενδείξεις συστηματικού αυτοάνοσου ρευματικού νοσήματος (SARD). Η παρουσία τους τεκμηριώθηκε αρχικά σε ασθενείς με συγκεκριμένες φλεγμονώδεις παθήσεις και σε «φαινομενικά» υγιή άτομα¹⁵⁻¹⁷. Τα αντισώματα DFS70 παράγουν ένα πρότυπο που συγχέεται με το ομοιογενές (συσχετιζόμενο με DNA, ιστόνες και νουκλεοσώματα) ή το λεπτό στικτό πρότυπο, το οποίο συσχετίζεται με τα συστηματικά αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα. Στα πλακίδια που παρέχονται με το παρόν κιτ, τα κανονικά κύτταρα HEp-2 (HEP2) είναι αναμειγμένα με κύτταρα HEp-2 στα οποία το γονίδιο psip1 έχει αδρανοποιηθεί (eHEP2), σε αναλογία 1:9. Τα μη τροποποιημένα HEP2 ανιχνεύουν όλες τις ειδικότητες αυτοαντισωμάτων. Τα κύτταρα eHEP2 είναι σε θέση να ανιχνεύουν όλες τις ειδικότητες αυτοαντισωμάτων εκτός των DFS70, τα οποία συσχετίζονται με το psip1/LEDGF. Επομένως, η χρήση αυτού του προϊόντος προσφέρει πρόσθιτη λειτουργικότητα για τη διάκριση μεταξύ του ομοιογενούς, του στικτού και του πυκνού λεπτού στικτού προτύπου. Έτσι ενδέχεται να παρασχεθούν στο εργαστήριο περισσότερες πληροφορίες για την επιλογή κατάλληλων επιβεβαιωτικών μεθόδων ανάλυσης.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Με τη μέθοδο έμμεσου ανοσοφθορισμού που χρησιμοποιείται στο παρόν κιτ, ο ορός των ασθενών επωάζεται σε κυτταρικό υπόστρωμα HEp-2 για να καταστεί δυνατή η δεσμευση των αντισωμάτων. Τυχόν αντισώματα που δεν δεσμεύονται, απομακρύνονται με έκπλυση. Τα δεσμευμένα αντισώματα της κατηγορίας IgG ανιχνεύονται με την επώαση του υποστρώματος με σύζευγμα αντιανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG επισημασμένο με φλουορεσκεΐνη. Οι αντιδράσεις παρατηρούνται κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού εξοπλισμένο με τα κατάλληλα φίλτρα. Η παρουσία ANA, ASMA και AMA αποδεικνύεται με την ανίχνευση φθορισμού ανοιχτού πράσινου χρώματος, τον οποίο δίνουν συγκεκριμένες δομές των κυττάρων. Τα περισσότερα από τα παρόντα κύτταρα έχουν αδρανοποιημένο το γονίδιο psip1, γεγονός που αποτρέπει τον σχηματισμό θέσων σύνδεσης LEDGF σε αυτά τα κύτταρα. Το γεγονός αυτό καθιστά δυνατή τη

EL

Διαφοροποίηση του ομοιογενούς προτύπου ANA και του στικτού προτύπου από το πρότυπο DSF7018. Στη συνέχεια, οι τίτλοι (ως τίτλος ορίζεται το αντίστροφο της υψηλότερης αραίωσης που δίνει θετική αντίδραση) προσδιορίζονται με τη μέθοδο των διαδοχικών αραίωσεων¹⁹.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Φύλαξη και προετοιμασία

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

Υλικά που παρέχονται

Κιτ υποστρώματος HEp-2/DFS70 αδρανοποιημένων

| | |
|----------------|-------------------|
| [REF] 1108 | 60 προσδιορισμοί |
| [REF] 1108-120 | 120 προσδιορισμοί |
| [REF] 1108-240 | 240 προσδιορισμοί |

Υπόστρωμα HEp-2

[SORB|SLD|12]

Πλακίδιο υποστρώματος HEp-2/DFS70 αδρανοποιημένων, 12 βυθισμάτων, με γραμμωτό κωδικό (5x [REF] 1108, 10x [REF] 1108-120, 20x [REF] 1108-240)

1 x 0,5 ml

[CONTROL+|ANA-HOMO]

Διάλυμα θετικού ελέγχου για ANA. Περιέχει ανθρώπινο ορό.

1 x 0,5 ml

[CONTROL+|DFS70]

Διάλυμα θετικού ελέγχου για αντισώματα DFS70. Περιέχει ανθρώπινο ορό.

1 x 0,5 ml

[CONTROL-]

Διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Περιέχει ανθρώπινο ορό.

5 ml

[IgG-CONJ|FITC|EB]

Σύζευγμα αντιανθρώπινης ανοσοσφαρίνης IgG με FITC που περιέχει κυανό του Evans ως χρωστική αντίθεσης. Να προστατεύεται από το φως. (1x [REF] 1108, 2x [REF] 1108-120, 3x [REF] 1108-240)

60 ml

[BUF]

Ρυθμιστικά αραιωτικά διαλύματα (1x [REF] 1108, 1108-120, 2x [REF] 1108-240)

φιαλίδια

[BUF|WASH]

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) Διαλύστε κάθε φιαλίδιο σε 1L απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού. (2x [REF] 1108, 1108-120, 3x [REF] 1108-240)

5 ml

[MOUNTING|MEDIUM]

Μέσο επικάλυψης. Να μην καταψύχεται. (1x [REF] 1108, 1108-120, 2x [REF] 1108-240)

12 ανά κουτί

[COVER|SLD]

Καλυπτρίδες (1x [REF] 1108, 2x [REF] 1108-120, 4x [REF] 1108-240)

Προαιρετικά συστατικά

5 ml

[IgG-CONJ|FITC]

Συζευκτικό αντίσωμα FITC κατά της ανθρώπινης IgG. Να προστατεύεται από το φως [REF] 2100x.

1 ml

[EVANS]

Επίχρωση Evan's blue [REF] 2510*.

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

[LOT] Αριθμός Παρτίδας

[REF] Αριθμός καταλόγου

[IVD] Διαγνωστική χρήση in vitro

 Χρήση έως

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης

 Αριθμός δοκιμών

 Κατασκευαστής

 Ημερομηνία κατασκευής



* Κίνδυνος. Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο. Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση. Μην το χρησιμοποιήσετε πριν διαβάσετε και κατανοήσετε τις οδηγίες προφύλαξης. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: Συμβουλευθείτε / Επισκεφθείτε γιατρό. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια / πρόσωπο. Φυλάσσεται κλειδωμένο. Φυλάσσεται κλειδωμένο. Διάθεση του περιεχόμενου/περιέκτη στο εγκεκριμένο διάθεσης αποβλήτων.

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

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

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

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

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN_3) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, ξεπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζίδιων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

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

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

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

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μέθοδος ανάλυσης

A. Ανάλυση διαλογής

Οι οροί αισθενών που πρόκειται να δώσουν αντιδράσεις σε πλακίδια με υπόστρωμα HEp-2 πρέπει να αραιωθούν χρησιμοποιώντας αραιώση διαλογής 1:40. Με το υπόστρωμα HEp-2, μια ειδική αντίδραση σε αναλογία 1:40 ή μεγαλύτερο τίτλο θεωρείται θετική.

1. Αραιώστε τον κάθε ορό αισθενών σε αναλογία 1:40 (10 μl ορού + 390 μl αραιωτικού). Μην αραιώνετε τα διαλύματα θετικού ελέγχου και αρνητικού ελέγχου. Φυλάξτε τα μη αραιωμένα δείγματα των ορών για να προσδιορίσετε τους τίτλους των αισθενών σε περίπτωση που οι δοκιμασίες διαλογής βρεθούν θετικές.
2. Αφήστε τις θήκες που περιέχουν τις αντικειμενοφόρους του υποστρώματος επί 10-15 λεπτά, προκειμένου να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρέστε προσεκτικά τις αντικειμενοφόρους χωρίς να αγγίξετε το υπόστρωμα.
3. Σημάνετε τις αντικειμενοφόρους και τοποθετήστε τις σε ένα θάλαμο επώασης που έχετε καλύψει με απορροφητικό χαρτί διαβρεγμένο με νερό ώστε να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση.
4. Αναστρέψτε το σταγονομετρικό φιαλίδιο και πιέστε απαλά ώστε να ρίξετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μl) από το διάλυμα αρνητικού ελέγχου στο βύθισμα #1. Ομοίως, ρίξτε 1 σταγόνα διαλύματος θετικού ελέγχου για ANA στο βύθισμα #2. Αποφεύγετε να γεμίζετε υπερβολικά τα βυθίσματα.
5. Χρησιμοποιώντας μια μικροπιπέτα ή πιπέτα Pasteur, προσθέστε 1 σταγόνα από τον αραιωμένο ορό του αισθενών στη θήκη #3.

EL

(περίπου 50 μl) στις υπόλοιπες κυψελίδες. Αποφύγετε την υπερπλήρωση των κυψελίδων.

6. Τοποθετήστε το καπάκι στο θάλαμο επώασης και επωάστε τις αντικειμενοφόρους επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εκπλύνετε με περίπου 10 ml PBS χρησιμοποιώντας μια πιπέτα ή εκπλύνετε την αντικειμενοφόρο σε κύπελλο που περιέχει PBS. Μη χρησιμοποιείτε φιάλη έκπλυσης. Μεταφέρετε την αντικειμενοφόρο αμέσως στο δοχείο Coplin και εκπλύνετε επί 10 λεπτά. Επαναλάβετε τη διαδικασία με όλες τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους.
8. Αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους από το δοχείο Coplin. Συπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. Τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο σε θάλαμο επώασης. Αναστρέψτε αμέσως το σταγονόμετρο του συζευκτικού αντισώματος και πιέστε το μαλακά για να προσθέσετε 1 σταγόνα (περίπου 50 μl) σε κάθε κυψελίδα.
9. Επαναλάβετε τα βήματα 7 και 8 για κάθε αντικειμενοφόρο.
10. Τοποθετήστε εκ νέου το καπάκι στο θάλαμο επώασης. Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το θάλαμο επώασης. Κρατήστε την αντικειμενοφόρο από το άκρο που φέρει τα στοιχεία και εμβαπτίστε την σε ένα κύπελλο με PBS για να αφαιρέσετε την περίσσεια συζευκτικού αντισώματος. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους σε ένα δίσκο χρώσης που περιέχει PBS επί 10 λεπτά. Εάν χρησιμοποιηθεί προαιρετικό συζευκτικό αντίσώμα χωρίς επίχρωση (δείτε τα προαιρετικά συστατικά στην ενότητα "Υλικά που παρέχονται"), μπορείτε να προσθέσετε 2-3 σταγόνες επίχρωσης Evans blue στην τελική έκπλυση. Επαναλάβετε για τις υπόλοιπες αντικειμενοφόρους. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τυχόν ακατάλληλη έκπλυση ενδέχεται να προκαλέσει αυξημένο φθορισμό υποβάθρου.
12. Αφαιρέστε μία αντικειμενοφόρο από το δίσκο χρώσης. Συπώστε την άκρη της αντικειμενοφόρου με απορροφητικό χαρτί για να αφαιρέσετε την περίσσεια PBS. Για να αποτρέψετε τυχόν αποξήρανση της αντικειμενοφόρου, προχωρήστε αμέσως στο επόμενο βήμα, ενόσω η αντικειμενοφόρος είναι ακόμη υγρή.
13. Εφαρμόστε την καλυπτρίδα, προσθέτοντας 3 σταγόνες μέσου επικάλυψης ομοιόμορφα επάνω της, και τοποθετήστε την πάνω στην αντικειμενοφόρο. Αποφύγετε την εφαρμογή άσκοπης πίεσης και αποτρέψτε την πλευρική πίεση της καλυπτρίδας.
14. Επαναλάβετε τα βήματα 12 και 13 για κάθε αντικειμενοφόρο.
15. Εξετάστε για ειδικό φθορισμό με μικροσκόπιο φθορισμού σε μεγέθυνση 200x ή μεγαλύτερη.

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

B. Προσδιορισμός τελικού σημείου (τιτλοδότηση)

Ένας ορός που δίνει θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία διαλογής μπορεί να υποβληθεί σε περαιτέρω δοκιμή αν ακολουθήθουν τα βήματα 5 έως 13, ώστε να προσδιοριστεί η κατάλληλη αραίωση διαλογής για το υπόστρωμα. Κάθε εκτέλεση εξέτασης πρέπει να περιλαμβάνει τα διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου. Κάνετε διαδοχικές αραίωσεις σε διπλάσιο όγκο, ξεκινώντας από διάλυμα με αναλογία αραίωσης 1:40. Το αντίστροφο της υψηλότερης αραίωσης που δίνει θετική αντίδραση είναι ο τίτλος.

Προετοιμασία των διαδοχικών αραίωσεων ξεκινώντας από την αναλογία 1:40

Για να δημιουργήσετε διαδοχικές αραίωσεις ενός δείγματος ασθενούς από το 1:40 έως το 1:1280, αριθμήστε αρχικά έξι σωληνάρια από το 1 έως το 6. Μπορείτε να χρησιμοποιήσετε περισσότερα σωληνάρια εάν επιθυμείτε υψηλότερο βαθμό τελικής αραίωσης. Προσθέστε 3,9 ml αραιωτικό δείγματος στο σωληνάριο 1 και από 0,2 ml στα σωληνάρια 2 έως 6. Μεταφέρετε με πιπέτα 0,1 ml μη αραιωμένου ορού στο σωληνάριο 1 και αναμείξτε σχολαστικά. Μεταφέρετε 0,2 ml από το σωληνάριο 1 στο σωληνάριο 2 και αναμείξτε σχολαστικά. Μετά από κάθε ανάμειξη, συνεχίστε να μεταφέρετε 0,2 ml από το ένα σωληνάριο στο επόμενο, ώστε να προκύψουν οι αραίωσεις που παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

| | | | | | | |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------|
| Σωληνάριο | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Ορός | 0,1 ml | | | | | |
| | + | | | | | |
| Αραιωτικό ρυθμιστικό | 3,9 ml | 0,2 ml |
| | Ճ | Ճ | Ճ | Ճ | Ճ | Ճ |
| Μεταφορά | 0,2 ml | |
| Τελική αραίωση | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 κλπ. |

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Μαζί με κάθε εκτέλεση εξέτασης θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται ένα διάλυμα θετικού ελέγχου και ένα διάλυμα αρνητικού ελέγχου. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου δεν πρέπει να εμφανίσει ειδικό φθορισμό των πυρήνων. Το διάλυμα θετικού ελέγχου για ANA θα πρέπει να εμφανίζει ένταση χρώσης των πυρήνων 2+ ή μεγαλύτερη, με πρότυπο χρώσης που θα είναι εν πολλοίς ομοιόμορφο.

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

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

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

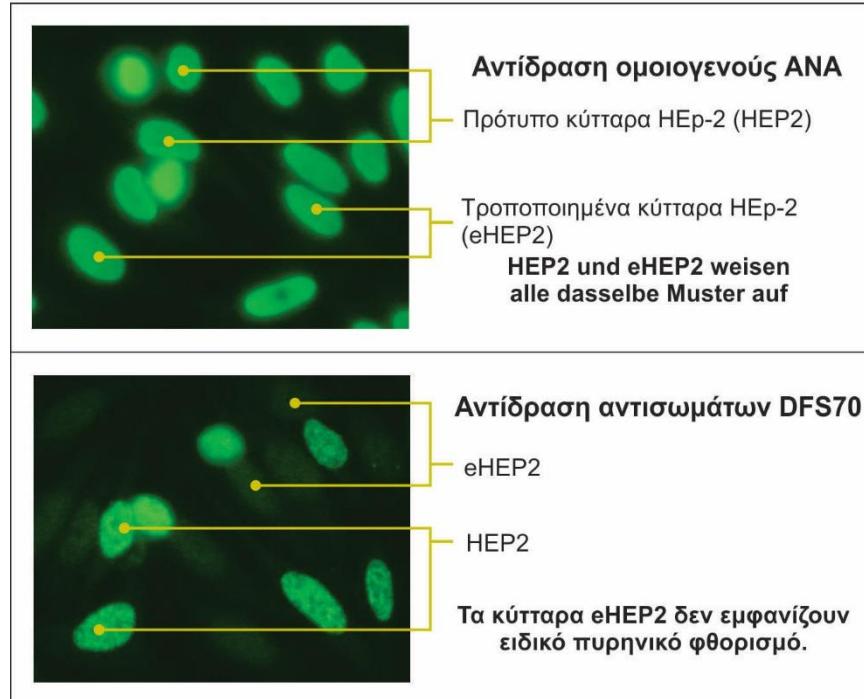
Τα αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικά, θετικά ή, εφόσον προσδιοριστεί ο τίτλος τελικού σημείου, θετικά με τίτλο. Συνιστάται τα δείγματα ασθενών που εμφανίζουν ειδικές αντιδράσεις φθορισμού σε αραίωση 1:40 να αναφέρονται ως θετικά. Η αραίωση αυτή χρησιμεύει ως οδηγός για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Κάθε εργαστήριο πρέπει να καθορίζει τις δικές του φυσιολογικές τιμές, οι οποίες θα λαμβάνουν υπόψη τις διαφορές στα συστήματα μικροσκοπίας, το προσωπικό και την εκπαίδευση

Να διαβάζονται μόνο τα πεδία που περιλαμβάνουν ειδική χρώση των κυττάρων HEp-2 και τα πρότυπα που παρατηρούνται με τα ANA, τα AMA και τα ASMA. Όλες οι άλλες αντιδράσεις θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικές.

Τα ANA μπορούν να προσδιοριστούν πιο σοτοκά στα κύτταρα HEp-2. Το πρότυπο χρώσης του πυρήνα μπορεί να είναι ομοιογενές, περιφερικό (στον δακτύλιο), στικτό, πυρηνισκό και κεντρομεριδιακό. Αυτά τα πρότυπα χρώσης των πυρήνων περιγράφονται παρακάτω. Ενδέχεται να παρατηρηθεί μόνο ένα πρότυπο χρώσης ή συνδυασμός περισσοτέρων. Το δεύτερο ενδεχόμενο οφείλεται σε αντιδράσεις με αρκετά διαφορετικά πυρηνικά αντιγόνα.

| | |
|-------------------------------|---|
| Ομοιογενές: | Όλος ο πυρήνας φθορίζει ομοιόμορφα με ένα διάχυτο πρότυπο χρώσης. |
| Πυρηνικός μεμβρανώδης: | Οι πυρηνικοί λεκέδες μεμβρανών ο πιό έντονα ως λεπτό γραμμικό σχέδιο με τη μειωμένος ένταση λειάσματος του πυρηνοπλάσματος προς το κέντρο του πυρήνα. |
| Στικτό: | Διακριτικές αδρές ή λεπτές στρογγυλές κηλίδες φθορίζουν σε όλη την έκταση του πυρήνα. |
| Πυρηνίσκου: | Οι πυρηνίσκοι χρωματίζονται ως πολλαπλά στερεά σωμάτια εντός του πυρήνα. Πεπερασμένος αριθμός μεγάλων κηλίδων. |
| DFS70: | Πρότυπο κύτταρα HEp-2 (HEP2): Σε περίπου ~10% των κυττάρων κάθε βυθίσματος θα παρατηρηθεί πυκνό λεπτό στικτό πρότυπο στον μεσοφασικό πυρήνα. Χρώση που σχετίζεται με τη χρωματίνη διαπιστώνεται σε μιτωτικούς πυρήνες. Τροποποιημένα κύτταρα HEp-2 (eHEP2): Στο υπόλοιπο ~90% των κυττάρων HEp-2, το γονίδιο psip1 που κωδικοποιεί το αντιγόνο LEDGF είναι αδρανοποιημένο και επομένως δεν προκύπτει παρόμοιο πρότυπο. |
| | Εάν το 10% των κυττάρων HEp-2 έχει μεγαλύτερης φωτεινότητας φθορισμό που αντιστοιχεί σε πρότυπο DFS70 και τα υπόλοιπα κύτταρα εμφανίζουν πρόσθετα πρότυπα ή λεπτό στικτό σήμα πάνω από το όριο αποκοπής, αυτό αποτελεί ένδειξη της παρουσίας μεικτών προτύπων. Η προσεκτικότερη ανάλυση αυτών των προτύπων είναι απαραίτητη για να επιβεβαιωθεί η παρουσία και άλλων ειδικοτήτων αντισωμάτων, εκτός του προτύπου DFS70 που συνδέεται με το LEDGF/psip1. |

Σχήμα 1. Αντιδράσεις της αναφοράς



Η ειδικότητα ορισμένων από τα αντισώματα που δίνουν τα παραπάνω πρότυπα χρώσης μπορεί να ταυτοποιηθεί περαιτέρω με εξετάσεις για αντισώματα κατά του nDNA και κατά διάφορων εκχυλίσιμων πυρηνικών αντιγόνων. Αυτά μπορεί να διαθέτουν διαγνωστική σημασία, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Διαγνωστική σημασία των αντιπυρηνικών αντισωμάτων

| Πρότυπο χρώσης IF | Φύση του αντιγόνου | Σχετιζόμενη νόσος |
|----------------------------------|--|---|
| Ομοιογενές | dsDNA/Ιστόνες | ΣΕΛ |
| Πυρηνικής μεμβράνης | Λαμινίνες | ΣΕΛ, αγγειίτιδα ή χρόνια ηπατίτιδα |
| Στικτό | RNP | ΣΕΛ ή MCTD* |
| | Sm | ΣΕΛ |
| | SS-A/SS-B | ΣΕΛ ή σύνδρομο Sjögren |
| | Scl-70 | Σκληροδερμία |
| Πυρηνισκικό | RNAP-I Pm-Scl RNA/ πιθανότατα U3 RNA | Σκληροδερμία |
| Κεντρομεριδιακό/ κινητοχωρίου | εσωτερικές και εξωτερικές πλάκες του κινητοχωρίου | Σύνδρομο CREST |
| DFS70 ¹⁵⁻¹⁸ | Πυκνό λεπτό στικτό πρότυπο (θετικό σε ~10% των κυττάρων ή σχετικά υψηλότερο σήμα φθορισμού σε ~10% των κυττάρων) | Αρνητική σύνδεση με συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα. Αναφέρεται σε ατοπική δερματίτιδα, γυροειδή αλωπεκία, νόσο Vogt - Koyanagi - Harada (VKH), συμπαθητική οφθαλμία, νόσο Αδαμαντίδη-Be赫cet και άτυπη εκφύλιση αμφιβληστροειδούς. |

* Μεικτή νόσος του συνδετικού ιστού

Τα ανιχνεύσιμα κυτταροπλασματικά αντισώματα περιλαμβάνουν τα αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA) και τα αντισώματα κατά των λείων μυϊκών ινών (ASMA). Σε πρότυπο AMA, το κυτταρόπλασμα έχει κοκκιώδη εμφάνιση, ενώ με το πρότυπο ASMA η χρώση αποκαλύπτει ένα ινώδες δίκτυο σε όλη την έκταση του κυτταροπλάσματος. Και τα δύο αυτά πρότυπα πρέπει να αναφέρονται αρνητικά ως προς ANA.

ΕΛ

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

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

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

Το συζευκτικό αντίσωμα αιγάλεος FITC κατά της ανθρώπινης IgG που παρέχεται σε αυτό το κιτ είναι κατά κύριο λόγο ειδικό για τις βαριές αλυσίδες, αλλά εμφανίζει κάποια δραστικότητα και κατά των ελαφριών αλυσίδων. Αντιδρά κυρίως με τα αυτοαντισώματα τάξης IgG, αλλά ενδέχεται να αλληλεπιδρά, σε μικρότερο βαθμό, με τις ελαφριές αλυσίδες άλλων τάξεων, όπως η IgM.

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

Ο κλινικός ιατρός θα πρέπει να εξετάσει τα αποτελέσματα όλων των θετικών αναλύσεων έμμεσου ανοσοφθορισμού, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα άλλων εργαστηριακών εξετάσεων και την κλινική κατάσταση του ασθενούς, προκειμένου να καταλήξει σε διάγνωση.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Οι εξετάσεις για τα πυρηνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται στη διαλογή ασθενών με ΣΕΛ και για ορισμένες ακόμη ανοσολογικές διαταραχές. Τα AMA απαντούν σε περισσότερο από το 90% των περιστατικών πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης και στο 3-11% των περιστατικών χρόνιας ηπατίτιδας. Τα ASMA απαντούν στην πλειονότητα των περιστατικών χρόνιας ενεργού ηπατίτιδας.

Πίνακας 2: Επίπτωση αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) που ανιχνεύθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε κύτταρα HEp-2

| Κλινική κατάσταση | Αριθμός ορών που εξετάστηκαν | % θετικών |
|---|---------------------------------|-----------|
| ΣΕΛ | 12 | 100 |
| Υποξύς δερματικός ερυθηματώδης λύκος (ΥΔΕΛ) | 7 | 86 |
| Σκληροδερμία | 6 | 100 |
| Ρευματοειδής αρθρίτιδα | 10 | 50 |
| Φυσιολογικοί μάρτυρες | 15 | 0 |

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

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

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

| Κλινική κατάσταση | Αριθμός ορών | Immco | % θετικά Άλλη |
|---|--------------|-------|------------------|
| ΣΕΛ | 12 | 100 | 100 |
| Υποξύς δερματικός ερυθηματώδης λύκος (ΥΔΕΛ) | 7 | 85 | 85 |
| Σκληροδερμία | 6 | 100 | 100 |
| Ρευματοειδής αρθρίτιδα | 10 | 50 | 30 |
| Φυσιολογικοί μάρτυρες | 15 | 0 | 0 |

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικά, θετικά ή, εφόσον προσδιοριστεί ο τίτλος τελικού σημείου, θετικά με τίτλο. Συνιστάται τα δείγματα ασθενών που εμφανίζουν ειδικές αντιδράσεις φθορισμού σε αραίωση 1:40 να αναφέρονται

ΕΛ

ως θετικά. Η αραίωση αυτή χρησιμεύει ως οδηγός για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Κάθε εργαστήριο πρέπει να καθορίζει τις δικές του φυσιολογικές τιμές, οι οποίες θα λαμβάνουν υπόψη τις διαφορές στα συστήματα μικροσκοπίας, το προσωπικό και την εκπαίδευση.

Να διαβάζονται μόνο τα πεδία που περιλαμβάνουν ειδική χρώση των κυττάρων HEp-2 και τα πρότυπα που παρατηρούνται με τα ANA, τα AMA και τα ASMA. Όλες οι άλλες αντιδράσεις θα πρέπει να αναφέρονται ως αρνητικές.

Τα ANA μπορούν να προσδιοριστούν πιο σταθερά στα κύτταρα HEp-2. Το πρότυπο χρώσης του πυρήνα μπορεί να είναι ομοιογενές, περιφερικό (στον δακτύλιο), στικτό, πυρηνισκό και κεντρομεριδιακό. Αυτά τα πρότυπα χρώσης των πυρήνων περιγράφονται παρακάτω. Ενδέχεται να παρατηρηθεί μόνο ένα πρότυπο χρώσης ή συνδυασμός περισσοτέρων. Το δεύτερο ενδεχόμενο οφείλεται σε αντιδράσεις με αρκετά διαφορετικά πυρηνικά αντιγόνα.

Ομοιογενές: Όλος ο πυρήνας φθορίζει ομοιόμορφα με ένα διάχυτο πρότυπο χρώσης.

Πυρηνικός μεμβρανώδης: Οι πυρηνικοί λεκέδες μεμβρανών ο πιο έντονα ως λεπτό γραμμικό σχέδιο με τη μειωμένος ένταση λε κιάσματος του πυρηνοπλάσματος προς το κέντρο του πυρήνα.

Στικτό: Διακριτικές αδρές ή λεπτές στρογγυλές κηλίδες φθορίζουν σε όλη την έκταση του πυρήνα.

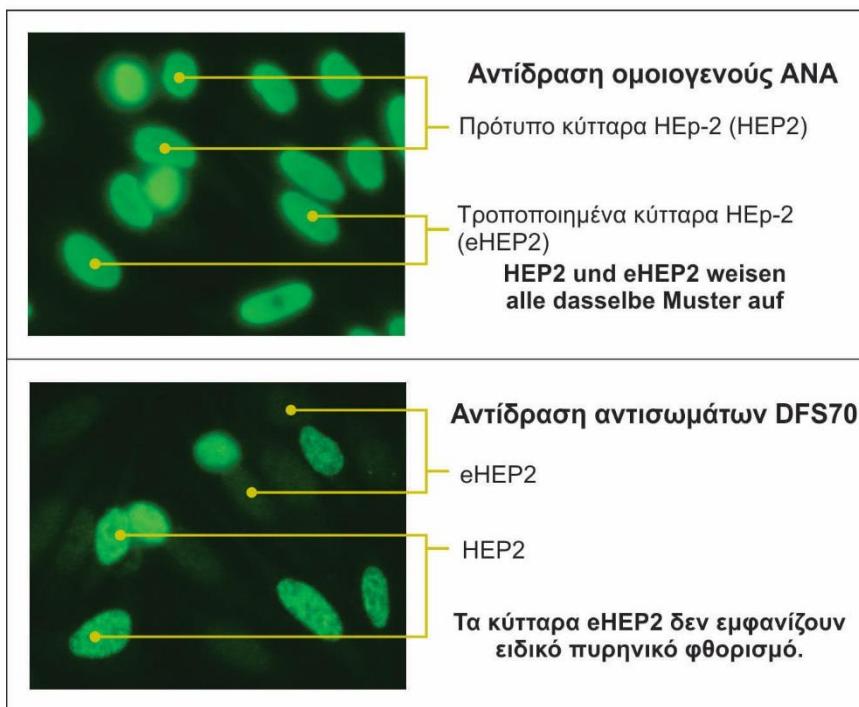
Πυρηνίσκου: Οι πυρηνίσκοι χρωματίζονται ως πολλαπλά στερεά σωμάτια εντός του πυρήνα. Πεπερασμένος αριθμός μεγάλων κηλίδων.

DFS70: Κανονικά HEp-2 (HEP2): Σε περίπου ~10% των κυττάρων κάθε βυθίσματος θα παρατηρηθεί πυκνό λεπτό στικτό πρότυπο στον μεσοφασικό πυρήνα. Χρώση που σχετίζεται με τη χρωματίνη διαπιστώνεται σε μιτωτικούς πυρήνες.

Τροποποιημένα HEp-2 (eHEP2): Στο υπόλοιπο ~90% των κυττάρων HEp-2, το γονίδιο psip1 που κωδικοποιεί το αντιγόνο LEDGF είναι αδρανοποιημένο και επομένως δεν προκύπτει παρόμοιο πρότυπο.

Εάν το 10% των κυττάρων HEp-2 έχει μεγαλύτερης φωτεινότητας φθορισμό που αντιστοιχεί σε πρότυπο DFS70 και τα υπόλοιπα κύτταρα εμφανίζουν πρόσθετα πρότυπα ή λεπτό στικτό σήμα πάνω από το όριο αποκοπής, αυτό αποτελεί ένδειξη της παρουσίας μεικτών προτύπων. Η προσεκτικότερη ανάλυση αυτών των προτύπων είναι απαραίτητη για να επιβεβαιωθεί η παρουσία και άλλων ειδικοτήτων αντισωμάτων, εκτός του προτύπου DFS70 που συνδέεται με το LEDGF/psip1.

Σχήμα 1. Αντιδράσεις της αναφοράς



Η ειδικότητα ορισμένων από τα αντισώματα που δίνουν τα παραπάνω πρότυπα χρώσης μπορεί να ταυτοποιηθεί περαιτέρω με εξετάσεις για αντισώματα κατά του nDNA και κατά διάφορων εκχυλίσμων πυρηνικών αντιγόνων. Αυτά μπορεί να διαθέτουν διαγνωστική σημασία, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Διαγνωστική σημασία των αντιπυρηνικών αντισωμάτων

| Πρότυπο χρώσης IF | Φύση του αντιγόνου | Σχετιζόμενη νόσος |
|----------------------------------|---|---|
| Ομοιογενές | dsDNA/Ιστόνες | ΣΕΛ |
| Πυρηνικής μεμβράνης | Λαμινίνες | ΣΕΛ, αγγειίτιδα ή χρόνια ηπατίτιδα |
| Στικτό | RNP | ΣΕΛ ή MCTD* |
| | Sm | ΣΕΛ |
| | SS-A/SS-B | ΣΕΛ ή σύνδρομο Sjögren |
| | Scl-70 | Σκληροδερμία |
| Πυρηνισκό | RNAP-I Pm-Scl RNA/ πιθανότατα U3 RNA | Σκληροδερμία |
| Κεντρομεριδιακό/ κινητοχωρίου | εσωτερικές και εξωτερικές πλάκες του κινητοχωρίου | Σύνδρομο CREST |
| DFS70 ¹⁵⁻¹⁸ | Πικνό λεπτό στικτό ¹⁵ πρότυπο (θετικό σε ~10% των κυττάρων ή σχετικά υψηλότερο σήμα φθορίσμού σε ~10% των κυττάρων) | Αρνητική σύνδεση με συστηματικά αυτόνομα νοσήματα. Αναφέρεται σε ατοπική δερματίτιδα, γυροειδή αλωπεκία, νόσο Vogt - Koyanagi - Harada (VKH), συμπαθητική οφθαλμία, νόσο Αδαμαντιάδη- Behcet και άτυπη εκφύλιση αμφιβληστροειδούς. |

* Μεικτή νόσος του συνδετικού ιστού

Τα ανιχνεύσιμα κυτταροπλασματικά αντισώματα περιλαμβάνουν τα αντιμιτοχονδριακά αντισώματα (AMA) και τα αντισώματα κατά των λείων μυϊκών ινών (ASMA). Σε πρότυπο AMA, το κυτταρόπλασμα έχει κοκκιώδη εμφάνιση, ενώ με το πρότυπο ASMA η χρώση αποκαλύπτει ένα ινώδες δίκτυο σε όλη την έκταση του κυτταροπλάσματος. Και τα δύο αυτά πρότυπα πρέπει να αναφέρονται αρνητικά ως προς ANA.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

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

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

Το συζευκτικό αντίσωμα αιγάλευτος FITC κατά της ανθρώπινης IgG που παρέχεται σε αυτό το κιτ είναι κατά κύριο λόγο ειδικό για τις βαριές αλυσίδες, αλλά εμφανίζει κάποια δραστικότητα και κατά τών ελαφριών αλυσίδων. Αντιδρά κυρίως με τα αυτοαντισώματα τάξης IgG, αλλά ενδέχεται να αλληλεπιδρά, σε μικρότερο βαθμό, με τις ελαφριές αλυσίδες άλλων τάξεων, όπως η IgM.

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

Ο κλινικός ιατρός θα πρέπει να εξετάσει τα αποτελέσματα όλων των θετικών αναλύσεων έμμεσου ανοσοφθορισμού, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα άλλων εργαστηριακών εξετάσεων και την κλινική κατάσταση του ασθενούς, προκειμένου να καταλήξει σε διάγνωση.

ANAMENOMENES ΤΙΜΕΣ

Οι εξετάσεις για τα πυρηνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται στη διαλογή ασθενών με ΣΕΛ και για ορισμένες ακόμη ανοσολογικές διαταραχές. Τα AMA απαντούν σε περισσότερο από το 90% των περιστατικών πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης και στο 3-11% των περιστατικών χρόνιας ηπατίτιδας. Τα ASMA απαντούν στην πλειονότητα των περιστατικών χρόνιας ενεργού ηπατίτιδας.

EL

Πίνακας 2: Επίπτωση αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA) που ανιχνεύθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε κύτταρα HEp-2

| Κλινική κατάσταση | Αριθμός ορών που εξετάστηκαν | % θετικών |
|---|------------------------------|-----------|
| ΣΕΛ | 12 | 100 |
| Υποξύς δερματικός ερυθηματώδης λύκος (ΥΔΕΛ) | 7 | 86 |
| Σκληροδερμία | 6 | 100 |
| Ρευματοειδής αρθρίτιδα | 10 | 50 |
| Φυσιολογικοί μάρτυρες | 15 | 0 |

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

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

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

| Κλινική κατάσταση | Αριθμός ορών | Immco | % θετικά | Άλλη |
|---|--------------|-------|----------|------|
| ΣΕΛ | 12 | 100 | 100 | |
| Υποξύς δερματικός ερυθηματώδης λύκος (ΥΔΕΛ) | 7 | 85 | 85 | |
| Σκληροδερμία | 6 | 100 | 100 | |
| Ρευματοειδής αρθρίτιδα | 10 | 50 | 30 | |
| Φυσιολογικοί μάρτυρες | 15 | 0 | 0 | |

HEp-2 / DFS70 inactivado IFA

PROSPECTO DEL PRODUCTO

[IVD]

| | | | |
|------------|----------|--|---------------------|
| REF | 1108 | Kit de sustrato HEp-2/DFS70 inactivado | 60 determinaciones |
| REF | 1108-120 | Kit de sustrato HEp-2/DFS70 inactivado | 120 determinaciones |
| REF | 1108-240 | Kit de sustrato HEp-2/DFS70 inactivado | 240 determinaciones |

USO PREVISTO

Prueba de inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos para la detección y cuantificación de anticuerpos antinucleares en suero humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La detección de anticuerpos antinucleares (ANA) mediante inmunofluorescencia indirecta ayuda en el diagnóstico de enfermedades del tejido conectivo, entre ellas el lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjögren, esclerodermia y otras patologías del tejido conectivo¹⁻⁵. Alrededor del 95% de pacientes con LES es ANA positivo, así como pacientes con otras enfermedades del tejido conectivo. Pueden obtenerse resultados positivos para ANA en otras enfermedades tales como hepatitis activa crónica y cirrosis biliar primaria⁶⁻⁸.

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

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

Los anticuerpos anti-DFS70 producen un patrón de inmunofluorescencia nuclear moteado fino y denso (DSF70) en las células HEp-2. Estos autoanticuerpos se dirigen a un antígeno de 70 kDa también conocido como Factor de Crecimiento Derivado del Epitelio del Cristalino (LEDGF, por sus siglas en inglés) o producto génico psip1. Estos han sido reportados inicialmente ocurrir en sueros de pacientes con pruebas positivas de ANA, pero sin evidencia clínica de enfermedad reumática autoinmune sistémica (SARD, por sus siglas en inglés). Su presencia fue inicialmente documentada en pacientes con ciertas enfermedades inflamatorias e individuos "aparentemente" sanos¹⁵⁻¹⁷. Los anticuerpos DFS70 producen un patrón que puede ser confundido como homogéneo (asociado con ADN, histonas y nucleosomas) o un patrón moteado fino asociado con SARDs. En los portaobjetos proporcionados con este kit, los HEp-2 (HEP2) estándar se mezclan con HEp-2 con el gen psip1 knocked out (eHEP 2) en una relación 1:9. Los HEP2 no diseñados detectan todas las especificidades de autoanticuerpos. Las células eHEP2 son capaces de detectar todas las especificidades de autoanticuerpos exceptuando el DFS70 asociado con psip1/LEDGF. Por lo tanto el uso de este producto proporciona una funcionalidad adicional para discriminar patrones homogéneos, moteados, y moteados finos densos. Esto puede proporcionar al laboratorio más información para seleccionar los ensayos confirmatorios apropiados.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

En el método de IF indirecta utilizado en este kit, el suero del paciente es incubado en substratos de células HEp-2 para permitir la unión de anticuerpos. Cualquier anticuerpo no unido es eliminado por lavado. Los anticuerpos unidos de la clase IgG se detectan mediante incubación del sustrato con fluoresceína-etiquetada, conjugado IgG anti-humano. Las reacciones se observaron bajo un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros apropiados. La presencia de ANA, ASMA, y AMA se demuestra mediante un verde manzana fluorescente de estructuras específicas en las células. Una mayoría de las células presentes tienen el gen psip1 inactivado que previene la formación de sitios de unión LEDGF en estas células. Esto permite la diferenciación de los ANA homogéneos y de los patrones de reacción moteada de los patrones DSF70¹⁸. Los títulos (el recíproco de la mayor dilución que da una reacción positiva) se determinan mediante pruebas de diluciones seriadas¹⁹.

ES

DATOS DEL PRODUCTO

Conservación y preparación

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

Material suministrado

Kit de sustrato HEp-2/DFS70 inactivado

[REF] 1108 60 Determinaciones

[REF] 1108-120 120 Determinaciones

[REF] 1108-240 240 Determinaciones

| | | |
|------------------------|----------------------|---|
| Sustrato HEp-2 | [SORB SLD 12] | Pocillo con código de barras 12, portaobjetos con sustrato HEp2/DFS70 inactivado (5x [REF] 1108, 10x [REF] 1108-120, 20x [REF] 1108-240) |
| 1 x 0.5 ml | [CONTROL + ANA-HOMO] | Control positivo ANA. Contiene suero humano. |
| 1 x 0.5 ml | [CONTROL + DFS70] | Control positivo anticuerpo DFS70. Contiene suero humano. |
| 1 x 0.5 ml | [CONTROL -] | Control negativo. Contiene suero humano. |
| 5 ml | [IgG-CONJ FITC EB] | Conjugado IgG FITC anti-humano que contiene contraste azul de Evans. Proteger de la luz. (1x [REF] 1108, 2x [REF] 1108-120, 3x [REF] 1108-240) |
| 60 ml | [BUF] | Diluyentes tamponados. (1x [REF] 1108, 1108-120, 2x [REF] 1108-240) |
| viales | [BUF WASH] | Solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). Disolver cada vial en 1L de agua destilada o desionizada. (2x [REF] 1108, 1108-120, 3x [REF] 1108-240) |
| 5 ml | [MOUNTING MEDIUM] | Medio de montaje. No congelar. (1x [REF] 1108, 1108-120, 2x [REF] 1108-240) |
| 12 por caja | [COVER SLD] | Cubreobjetos. (1x [REF] 1108, 2x [REF] 1108-120, 4x [REF] 1108-240) |
| Componentes opcionales | | |
| 5 ml | [IgG-CONJ FITC EB] | Conjugado de IgG antihumana FITC. Protéjase de la luz. [REF] 2100x. |
| 1 ml | [EVANS] | Contratinción azul de Evans. [REF] 2510*. |

Símbolos empleados en las etiquetas:

[LOT] Número de lote

[REF] Número de catálogo

[IVD] Utilización diagnóstica in vitro

Utilizar antes de

Temperatura de almacenamiento

Consulte las instrucciones de uso

Número de análisis

Fabricante

Fecha de fabricación



*Peligro. Puede provocar cáncer. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Pedir instrucciones especiales antes del uso. No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad. EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Guardar bajo llave. Eliminar el contenido/el recipiente de residuos.

Material necesario no incluido

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

ADVERTENCIAS

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

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

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

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

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

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

El suero del paciente a ser reaccionado en el portaobjetos con sustrato HEp-2 debe diluirse utilizando dilución de cribado 1:40. En HEp-2 una reacción específica a 1:40 o titulación superior se considera positiva.

1. Diluir cada suero del paciente 1:40 (10 µl suero + 390 µl diluyente). No diluir los Controles Positivo o Negativo. Guardar el suero no diluido para determinar las titulaciones de anticuerpos si las pruebas de detección se han encontrado ser positivas.
2. Espere a que las bolsas con las láminas los portas de substrato se estabilicen a la temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Extraiga las láminas los portas cuidadosamente sin tocar el substrato.
3. Etiquete las láminas los portas y colóquelas colóquelas en la cámara de incubación acondicionada con toallas de papel humedecidas para mantener las condiciones de humedad adecuadas.
4. Invertir el vial cuentagotas y apretar suavemente para aplicar 1 gota (aproximadamente 50 µl) del Control Negativo al pocillo #1. Del mismo modo aplicar 1 gota del Control Positivo ANA al pocillo #2. Evitar llenar demasiado los pocillos.
5. Con una micropipeta o pipeta Pasteur, coloque 1 gota de suero diluido del paciente (aproximadamente 50 µl) en los restantes pocillos. No llene demasiado los pocillos.
6. Coloque la tapa de la cámara de incubación; incube las láminas los portas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Retire una lámina un porta de la cámara de incubación. Sosténgala por un extremo, lávela lávelo delicadamente con una pipeta y aproximadamente 10 ml de PBS, o bien en una taza llena recipiente lleno de PBS. No utilice frasco de lavado. Transfiera de inmediato la lámina el porta a una cubeta de Coplin y lávela lávelo durante 10 minutos. Repita el procedimiento con las los restantes láminas portas.
8. Retire las láminas los portas de la cubeta de Coplin. Seque el borde de las láminas los portas con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Ponga las láminas los portas en la cámara de incubación. Acto seguido, con

ES

el frasco gotero de conjugado aplique 1 gota (aproximadamente 50 µl) en cada pocilio.

9. Repita los pasos **7 y 8** para cada lámina porta.

10. Coloque la tapa en la cámara de incubación. Incube 30 minutos a temperatura ambiente.

11. Extraiga una lámina un porta de la incubadora del incubador. Sosténdola por un extremo, sumérjala en un recipiente con PBS para eliminar el exceso de conjugado. Ponga las láminas los portas en una cubeta de coloración llena de PBS durante 10 minutos. Si decide emplear conjugado sin contrastante contraste (véase Componentes opcionales en el apartado Materiales suministrados) puede añadir 2-3 gotas de contrastante contraste azul de Evans al lavado final. Repita el procedimiento en las láminas los portas restantes.
NOTA: un lavado inadecuado podría producir fluorescencia de fondo.

12. Retire una lámina un porta de la cubeta de coloración. Seque el borde con una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. **Para evitar que la lámina el porta se seque, pase de inmediato a la fase sucesiva mientras la lámina el porta todavía está húmeda húmedo.**

13. Monte la laminilla el cubre aplicando uniformemente en la misma **3 gotas** de medio de montaje; ponga la laminilla el cubre sobre la lámina el porta sin presionar demasiado y evitando que la laminilla se desplace lateralmente.

14. Repita los pasos 12 y 13 para cada lámina porta.

15. Examine la fluorescencia específica con microscopio de fluorescencia con aumento de 200x o más.

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

B. Determinación de punto final (titulación)

Un suero positivo en la prueba de detección puede ser probado aún más siguiendo los pasos 5 al 13 para determinar la dilución de detección apropiada para el sustrato. Cada prueba realizada debe incluir los Controles Positivo y Negativo. Realizar dos diluciones seriadas a partir de 1:40. El recíproco de la dilución más alta que produce una reacción positiva es el título.

Preparación de diluciones en serie a partir de 1:40

Para crear diluciones seriadas de una muestra de paciente de 1:40 a 1:2560, comenzar por la numeración de seis tubos del 1 al 6. Se pueden utilizar más tubos si se desea una dilución final más alta. Añadir 3,9 ml de Diluyente de Muestra al tubo 1 y 0,2 ml en los tubos del 2 al 6. Pipetear 0,1 ml de suero sin diluir al tubo 1 y mezclar bien. Transferir 0,2 ml del tubo 1 al tubo 2 y mezclar bien. Continuar transfiriendo 0,2 ml de un tubo al siguiente después que la mezcla produzca las diluciones mostradas en la tabla siguiente:

| Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------|
| Suero | 0,1 ml | | | | | |
| | + | | | | | |
| Diluyente tamponado | 3,9 ml | 0,2 ml |
| | Ճ | Ճ | Ճ | Ճ | Ճ | Ճ |
| Transferir | | 0,2 ml |
| Dilución final | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 etc. |

CONTROL DE CALIDAD

Tanto el Control Positivo como el Negativo debe incluirse en cada ciclo. El Control Negativo no debe mostrar fluorescencia específica del núcleo. El Control Positivo ANA debe tener una intensidad de tinción del núcleo +2 o mayor con un patrón predominantemente homogéneo.

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

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

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados deben ser reportados como negativos, positivos, o, si se ha determinado el punto final del título, positivo con el título. Se recomienda que las muestras de pacientes que demuestren reacciones de fluorescencia específica a una dilución de 1:40 sean valores normales para justificar las diferencias en los sistemas de microscopía, personal y

ES capacitación

Leer sólo los campos que contienen tinción específica de las células HEp 2 y los patrones observados para ANA, AMA y ASMA. Todas las demás reacciones deben ser reportadas como negativas.

ANA se puede cuantificar en las células HEp-2. Los patrones de tinción nuclear observables incluyen homogéneo, periférico (borde), manchado, nucleolar y centrómero. Estos patrones de tinción nuclear se describen a continuación. Ellos pueden ser uno o una combinación de varios patrones de tinción. Estos últimos son debido a las reacciones a varios antígenos nucleares diferentes.

Homogénea: Todo el núcleo adquiere fluorescencia homogénea con patrón de tinción difusa.

Membranoso Nuclear: La membrana nuclear mancha lo más intenso posible como patrón muy bien linear con la intensidad de coloración de disminución del nucleoplasma hacia el centro del núcleo.

Moteada: Manchas discretas, de pequeñas a grandes, adquieren fluorescencia en todo el núcleo.

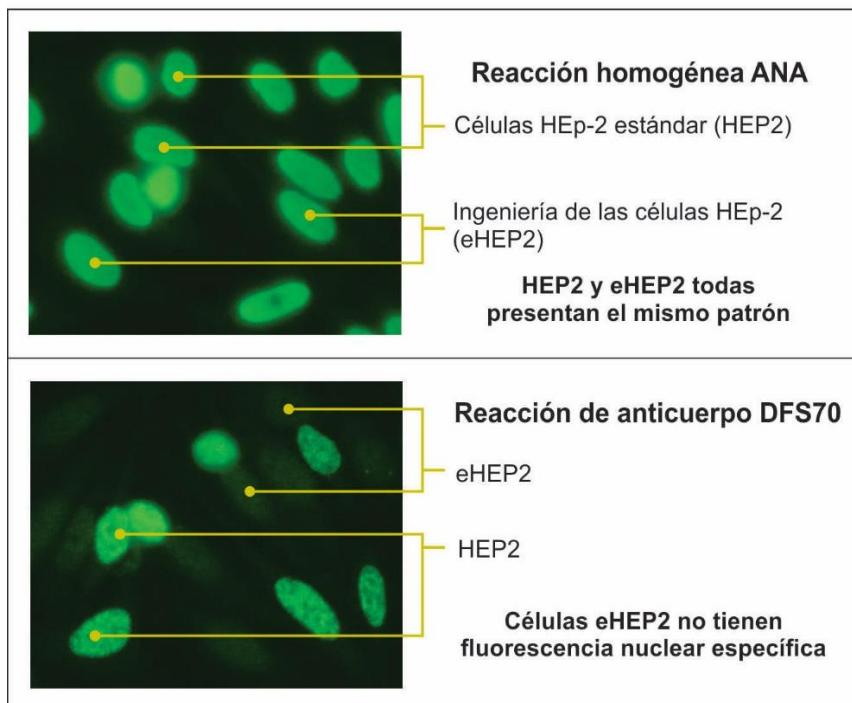
Nucleolar: Tinción de los nucleolos con motas grandes y gruesas en el núcleo.

DFS70: HEp-2 estándar (HEP2): En ~10% de las células en cada pocillo, un patrón moteado fino denso se observó en el núcleo interfase. La tinción asociada a la cromatina se ve en el núcleo mitótico.

HEp-2 (eHEP2) diseñado: El ~90% restante de células HEp-2 tienen el gen psip1 codificando el antígeno LEDGF knocked out y por lo tanto no va a producir un patrón similar

Si el 10% de las células HEp-2 tiene fluorescencia más brillante correspondiente al patrón DFS70 y el resto de las células presentan patrones adicionales o una señal de moteado fino por encima del corte, indica la presencia de patrones mixtos. Un análisis más detallado de tales patrones es esencial para confirmar que otra especificidad del anticuerpo está presente además del patrón DFS70 asociado con LEDGF/psip1.

Figura 1. Reacciones de referencia



La especificidad de algunos de los anticuerpos que dan los anteriores patrones de tinción puede identificarse además mediante pruebas para los anticuerpos al nDNA y a diversos antígenos nucleares extractables. Estos pueden ser de importancia diagnóstica según se señala en la Tabla 1.

Tabla 1. Importancia Diagnóstica de los Anticuerpos Antinucleares

| Patrón de Tinción IF | Naturaleza del Antígeno | Enfermedad Asociada |
|------------------------|--|---|
| Homogéneo | dsDNA/Histonas | Lupus Eritematoso Sistémico (SLE, por sus siglas en inglés) |
| Membranoso Nuclear | Lamininas | SLE, vasculitis o hepatitis crónica |
| Manchado | RNP | SLE o MCTD* |
| | Sm | SLE |
| | SS-A/SS-B | SLE o Síndrome de Sjögren |
| | Scl-70 | Esclerodermia |
| Nucleolar | RNAP-I | Esclerodermia |
| | Pm-Scl | |
| | RNA/ probablemente U3 RNA | |
| Centrómero/Cinetocoro | placas interiores y exteriores del cinetocoro | Síndrome CREST |
| DFS70 ¹⁵⁻¹⁸ | Patrón Moteado Fino Denso (positivo en ~10% de las células o señal de fluorescencia relativamente más alta en ~10% de las células) | Asociación negativa con enfermedades autoinmunes sistémicas; reportado en la dermatitis atópica, alopecia areata, enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH, por sus siglas en inglés), oftalmía simpática, enfermedad de Behçet y degeneración atípica de la retina. |

* Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo

Los anticuerpos citoplasmáticos detectables incluyen anticuerpos anti-mitocondriales y anticuerpos anti-músculo liso. En un patrón AMA, el citoplasma aparece granular, mientras que el patrón ASMA es una red fibrilar de tinción en todo el citoplasma. Ambos patrones deben ser reportados como negativos para ANA.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

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

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

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

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

VALORES ESPERADOS

Las pruebas de anticuerpos nucleares se utilizan para la detección del LES y otros trastornos inmunológicos. Los AMA se producen en más del 90% de los casos de cirrosis biliar primaria y en el 3-11% de los casos de hepatitis crónica. Los ASMA se producen en la mayoría de los casos de hepatitis activa crónica.

ES

Tabla 2: Incidencia de los Anticuerpos Antinucleares (ANA) Detectados por Inmunofluorescencia Indirecta en Células HEp-2

| Condición Clínica | Nº. de Suero | % Positivo |
|---------------------|--------------|------------|
| LES | 12 | 100 |
| LE cutáneo subagudo | 7 | 86 |
| Esclerodermia | 6 | 100 |
| Artritis Reumatoide | 10 | 50 |
| Controles Normales | 15 | 0 |

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

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

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

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

HEp-2 / DFS70 KO-IFA

PRODUKTBEILAGE

IVD

| | | | |
|-----|----------|-----------------------------|------------------|
| REF | 1108 | HEp-2/DFS70 KO-Substrat-Kit | 60 Bestimmungen |
| REF | 1108-120 | HEp-2/DFS70 KO-Substrat-Kit | 120 Bestimmungen |
| REF | 1108-240 | HEp-2/DFS70 KO-Substrat-Kit | 240 Bestimmungen |

VERWENDUNGSZWECK

Indirekter Immunfluoreszenz (IF) Antikörpertest zur Erkennung und Quantifizierung anti-nukleärer Antikörper (ANA) in Humanserum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

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

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

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

Anti-DFS70 Antikörper erzeugen ein nuklear dichtes, fein gesprengeltes Immunfluoreszenzmuster (DSF70) auf HEp-2-Zellen. Diese Autoantikörper zielen auf ein 70 kDa Antigen, auch LEDGF (Lens Epithelium Derived Growth Factor) oder psip1 Genprodukt genannt. Diese wurden ursprünglich in Seren von Patienten mit positiven ANA-Tests erkannt, es besteht jedoch kein klinischer Nachweis für SARD (systemische, autoimmune Rheumaerkrankungen). Ihre Anwesenheit wurde ursprünglich in Patienten mit gewissen inflammatorischen Zuständen und bei „scheinbar“ gesunden Personen¹⁵⁻¹⁷ berichtet. DFS70 Antikörper produzieren ein Muster, das als homogen (assoziiert mit DNA, Histon und Nukleosomen) oder dem fein gesprengelten Muster von SARD verwechselt werden kann. Auf den Trägern, die in diesem Kit enthalten sind, ist standard HEp-2 (HEP2) im Verhältnis 1:9 mit HEp-2 gemischt, dessen psip1-Gen inaktiviert wurde (eHEP2, „knocked-out“, KO). Nicht konstruiertes HEP2 erkennt alle Besonderheitender Autoantikörper. eHEP2-Zellen können alle Besonderheiten der Autoantikörper erkennen, außer DFS70, das mit psip1/LEDGF verbunden ist. Die Verwendung dieses Produkts bietet daher zusätzliche Funktionalität zur Unterscheidung homogener, gefleckter und dichter, fein gesprengelter Muster. Auf diese Weise erhält das Labor weitere Informationen, um die entsprechenden, bestätigenden Befunde auszuwählen.

TESTPRINZIP

Bei der in diesem Kit verwendeten IF-Methode werden die Patientenserien auf HEp-2 Zellsubstraten inkubiert, um die Bindung von Antikörpern zuzulassen. Alle ungebundenen Antikörper werden durch Spülen entfernt. Gebundene Antikörper der IgG-Klasse werden durch Inkubation des Substrats mit fluoreszeinmarkiertem, anti-Human-IgG-Konjugat erkannt. Reaktionen werden unter einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet, das mit den entsprechenden Filtern ausgestattet ist. Die Präsenz von ANA, ASMA und AMA wird durch apfelgrüne Fluoreszenz spezifischer Strukturen in den Zellen nachgewiesen. Bei der Mehrheit der anwesenden Zellen wurde das psip1-Gen inaktiviert, wodurch die Formung von LEDGF-Bindungen in diesen Zellen verhindert wird. Auf diese Weise können die homogenen und gesprengelten ANA-Reaktionsmuster von den DSF70-Mustern unterschieden werden¹⁸. Die Titer (ausgedrückt als Kehrwert der höchsten Verdünnung mit positiver Reaktion) werden dann durch die Prüfung der Verdünnungsreihen festgestellt¹⁹.

PRODUKTINFORMATION

Lagerung und Zubereitung

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

DE

Mitgelieferte Materialien

HEp-2/DFS70 KO-Substrat-Kit

| | | |
|-------|----------|------------------|
| [REF] | 1108 | 60 Bestimmungen |
| [REF] | 1108-120 | 120 Bestimmungen |
| [REF] | 1108-240 | 240 Bestimmungen |

| | | |
|----------------|----------------------|--|
| HEp 2 Substrat | [SORB SLD 12] | Barcode 12 Quelle HEp-2/DFS70 KO-Substrat-Träger (5x [REF] 1108, 10x [REF] 1108-120, 20x [REF] 1108-240) |
| 1 x 0,5 ml | [CONTROL + ANA-HOMO] | ANA positive Kontrolle. Enthält Humanserum. |
| 1 x 0,5 ml | [CONTROL + DFS70] | DFS70 positive Antikörperkontrolle. Enthält Humanserum. |
| 1 x 0,5 ml | [CONTROL -] | Negative Kontrolle. Enthält Humanserum. |
| 5 ml | [IgG-CONJ FITC EB] | Anti-Human IgG FITC-Konjugat mit Evans blue Gegenfärbung. Vor Licht schützen. (1x [REF] 1108, 2x [REF] 1108-120, 3x [REF] 1108-240) |
| 60 ml | [BUF] | Gepufferte Verdünnungen. (1x [REF] 1108, 1108-120, 2x [REF] 1108-240) |
| Ampullen | [BUF WASH] | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS). Lösen Sie jede Ampulle in 1l destilliertem oder deionisiertem Wasser. (2x [REF] 1108, 1108-120, 3x [REF] 1108-240) |
| 5 ml | [MOUNTING MEDIUM] | Lagermedium. Nicht einfrieren. (1x [REF] 1108, 1108-120, 2x [REF] 1108-240) |
| 12 pro Karton | [COVER SLD] | Deckglas. (1x [REF] 1108, 2x [REF] 1108-120, 4x [REF] 1108-240) |

Optionale Komponenten

| | | |
|------|-----------------|--|
| 5 ml | [IgG-CONJ FITC] | Anti-human IgG FITC Konjugat. Vor Licht schützen. [REF] 2100x. |
| 1 ml | [EVANS] | Evans-Blau-Gegenfärbung. [REF] 2510*. |

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

[LOT] Chargennummer

[REF] Katalognummer

[IVD] In vitro diagnostischer Gebrauch

Verwenden bis

Lagertemperatur

Finden Sie Anweisungen für die Verwendung

Anzahl an Tests

Hersteller

Herstellungsdatum

*Gefahr. Kann Krebs erzeugen. Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Unter Verschluss aufbewahren. Unter Verschluss aufbewahren. Inhalt/Behälter im genehmigten Abfallbeseitigung entsorgenGH-Einstufung.

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

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

DE

- Papiertücher
- Inkubationskammer

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

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

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

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

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

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

VERFAHREN

Testmethode

A. Suchtest

Patientenserien zur Reaktion auf Trägern mit HEp-2 Substrat sollten mit 1:40 Untersuchungslösung verdünnt werden. Bei HEp-2 gilt eine spezifische Reaktion bei einem Titer von 1:40 oder höher als positiv.

1. Lösen Sie jedes Patientenserum 1:40 (10 µl Serum + 390 µl Verdünnungsmittel). Verdünnen Sie keine positiven oder negativen Kontrollen. Bewahren Sie bei positiven Untersuchungsergebnissen unverdünnte Seren zur Feststellung von Antikörper-Titern auf.
2. Lassen Sie die Beutel mit den Substratobjekträgern 10-15 Minuten lang bei Raumtemperatur liegen. Entfernen Sie vorsichtig die Objekträger, ohne das Substrat zu berühren.
3. Kennzeichnen Sie die Objekträger und legen Sie sie in eine Inkubationskammer, die mit mit Wasser befeuchteten Papiertüchern ausgelegt ist, um das Austrocknen zu verhindern.
4. Tropfküvette invertieren und sanft drücken, um 1 Tropfen (ca. 50 µl) der negativen Kontrolle auf Quelle #1 zu geben. Geben Sie demgemäß 1 Tropfen ANA Positive Kontrolle zu Quelle #2. Vermeiden Sie das Überfüllen der Quellen.
5. Verwenden Sie eine Mikropipette oder Pasteurpipette, um jeweils 1 Tropfen (etwa 50 µl) des verdünnten Patientenserums in die übrigen Vertiefungen zu geben. Vermeiden Sie das Überfüllen der Vertiefungen.
6. Verschließen Sie die Inkubationskammer und inkubieren Sie die Objekträger 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
7. Entfernen Sie einen Objekträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objekträger am Ende mit dem Etikett an und spülen Sie ihn vorsichtig mit einer Pipette mit etwa 10 ml PBS ab, oder spülen Sie den Objekträger in einem mit PBS gefüllten Becher. Verwenden Sie keine Waschflasche. Geben Sie den Objekträger sofort in einen Coplin-Trog und waschen Sie ihn 10 Minuten lang. Wiederholen Sie diesen Vorgang mit allen anderen Objekträgern.
8. Entfernen Sie den/die Objekträger aus dem Coplin-Trog. Betupfen Sie den Rand des Objekträgers mit einem Papiertuch, um überschüssiges PBS zu entfernen. Legen Sie den Objekträger in die Inkubationskammer. Drehen Sie sofort das Tropffläschchen mit dem Konjugat um und drücken Sie es vorsichtig, um 1 Tropfen (etwa 50 µl) in jede Vertiefung zu geben.
9. Wiederholen Sie die Schritte **7 und 8** für jeden Objekträger.
10. Verschließen Sie die Inkubationskammer wieder. Inkubieren Sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.
11. Entfernen Sie einen Objekträger aus der Inkubationskammer. Fassen Sie den Objekträger am Ende mit dem Etikett an und tauchen Sie ihn in einen Becher mit PBS, um das überschüssige Konjugat zu entfernen. Belassen Sie den/die Objekträger 10 Minuten lang in einem mit PBS gefüllten Färbegefäß. Falls das optionale Konjugat ohne Gegenfärbung verwendet wird (siehe „Optionale Bestandteile“ im Abschnitt „Mitgelieferte Materialien“), können Sie der letzten Spülung 2-3 Tropfen Evans-Blau-Gegenfärbung hinzufügen. Wiederholen Sie den Vorgang mit den übrigen Objekträgern.

ANMERKUNG: Unsachgemäßes Waschen kann zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz führen.

DE

führen.

12. Entfernen Sie einen Objektträger aus dem Färbekasten. Betupfen Sie den Rand des Objektträgers mit einem Papiertuch, um überschüssiges PBS zu entfernen. **Fahren Sie sofort mit dem nächsten Schritt fort, während der Objektträger noch nass ist, um dessen Austrocknen zu verhindern.**
13. Bringen Sie das Deckgläschen an, indem Sie **3 Tropfen** Eideckmittel gleichmäßig auf das Deckgläschen auftragen und dieses auf den Objektträger legen. Üben Sie keinen übermäßigen Druck aus und verhindern Sie eine seitliche Bewegung des Deckgläschens.
14. Wiederholen Sie die Schritte 12 und 13 für jeden Objektträger.
15. Untersuchen Sie die Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop bei mindestens 200-facher Vergrößerung auf eine spezifische Fluoreszenz hin.

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

B. Endpunkt-Bestimmung (Titration)

Ein Serum, das bei der Untersuchung im Test positiv reagiert, kann mit den Schritten 5-13 weiter getestet werden, um die entsprechende Untersuchungsverdünnung für das Substrat zu ermitteln. Jeder Testlauf sollte positive und negative Kontrollen beinhalten. Fertigen Sie eine Reihe von zweifachen Verdünnungen an, wobei Sie mit 1:40 beginnen. Der Kehrwert der höchsten Verdünnung, die eine positive Reaktion hervorruft, ist der Titer.

Vorbereitung der Verdünnungsreihen, mit 1:40 beginnend

Um Verdünnungsreihen der Patientenprobe von 1:40 bis 1:1280 zu erstellen, beginnen Sie mit der Nummerierung von sechs Röhrchen von 1 bis 6. Sie können auch mehr Röhrchen verwenden, wenn eine höhere Endverdünnung gewünscht wird. Fügen Sie dem Röhrchen 1 3,9 ml des Probenverdünners hinzu, und je 0,2 ml zu den Röhrchen 2 bis 6. Pipettieren Sie 0,1 ml unverdünnten Serums in Röhrchen 1 - gut vermengen. Geben Sie 0,2 ml aus Röhrchen 1 zu Röhrchen 2 hinzu - gut vermengen. Übertragen Sie nach dem Vermengen 0,2 ml aus einem Röhrchen zum nächsten, um die in der folgenden Tabelle aufgeführten Verdünnungen zu erreichen:

| Röhrchen | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------|
| Serum | 0,1 ml | | | | | |
| | + | | | | | |
| Gepufferter Verdünnung | 3,9 ml | 0,2 ml |
| | ↗ | ↗ | ↗ | ↗ | ↗ | ↗ |
| Übertragung | | 0,2 ml |
| Endverdünnung | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 usw. |

QUALITÄTSKONTROLLE

Fügen Sie bei jedem Testlauf eine positive und eine negative Kontrolle hinzu. Die negative Kontrolle sollte keine spezifische Fluoreszenz des Nukleus ergeben. Die ANA Positivkontrolle sollte 2+ oder mehr Farbintensität des Nukleus ergeben mit einem vorwiegend homogenen Muster.

Falls mit den Kontrollseren weiterhin unzureichende Ergebnisse erzielt werden, kann dies folgende Ursachen haben:

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

AUSLEGUNG DER ERGEBNISSE

Ergebnisse sollten als positiv, negativ oder bei ermitteltem Endtiter als positiv mit Titer angegeben werden. Es ist empfehlenswert, dass Patientenproben mit spezifischen Fluoreszenzreaktionen bei einer Verdünnung von 1:40 als Normalwerte vermerkt werden, um Differenzen zwischen Mikroskopiesystemen, Personal und Training auszugleichen.

Lesen Sie nur die Felder mit spezifischen Färbungen der HEp-2-Zellen und den Mustern ab, die für AMA und ASMA beobachtet wurden. Alle anderen Reaktionen sollten als negativ verzeichnet werden.

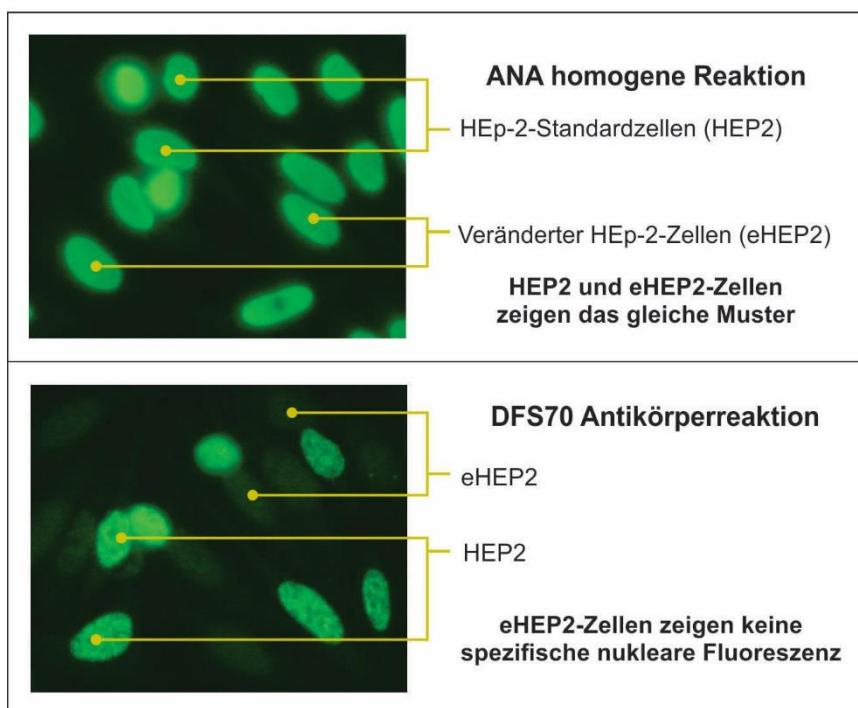
ANA kann auf den HEp-2-Zellen quantifiziert werden. Die beobachteten, nukleären Färbungsmuster umfassen homogen, peripher (Rahmen), gesprenkelt, nuklear und Zentromer. Diese nukleären Färbungsmuster werden nachstehend beschrieben. Sie können einzeln oder in einer Kombination mehrerer Färbungsmuster auftreten. Letzteres tritt aufgrund der Reaktionen zu mehreren verschiedenen nukleären Antigenen auf.

Homogen: Der gesamte Nukleus fluoresziert gleichmäßig mit einem diffusen Färbemuster.

DE

- Kernmembran:** Die Kernmembran befleckt am intensivsten als fein lineares Muster mit abnehmend befleckender Intensität des Zellkernplasmas zur Mitte des Kerns.
- Gefleckt (speckled):** Separate, grobe bis feine runde Flecken im gesamten Nukleus.
- Nukleolär:** Die Nukleoli werden innerhalb des Nukleus als mehrere feste Körper gefärbt.
- Centromermuster:** Große Flecken begrenzter Anzahl. Reaktive Antigene sondern sich in sich teilenden Zellen mit kondensierten Chromosomen ab.
- DFS70:** Standard HEp-2 (HEP2): In ~10% der Zellen in jeder Quelle kann ein dichtes, fein gesprengeltes Muster auf dem Zellkern der Interphase beobachtet werden. Auf mitotischen Zellkernen ist Chromatin-gebundene Färbung sichtbar.
Konstruiertes HEp-2 (eHEP2): Auf den übrigen ~90% der HEp-2 Zellen wurde die psip1-Genkodierung des LEDGF-Antigens inaktiviert („knocked out“) und sie produzieren daher kein ähnliches Muster.
Falls 10 % der HEp-2-Zellen im Verhältnis zum DFS70-Muster eine helle Fluoreszenz und der Rest der anwesenden Zellen zusätzliche Muster oder fein gesprengelte Signale über dem Grenzwert aufweisen, wird die Anwesenheit gemischter Muster angegeben. Die nähere Analyse solcher Muster ist erforderlich, um zu bestätigen, welche andere Antikörperbesonderheiten außer dem DFS70-Muster in Verbindung mit LEDGF/psip1 vorliegen.

Abbildung 1. Referenz-Reaktionen



Die Besonderheit mancher Antikörper, welche die o. g. Färbungsmuster ergeben, kann durch Antikörpertests für nDNA und verschiedene extrahierbare nukleäre Antigene weiter identifiziert werden. Diese können gemäß Tabelle 1 von diagnostischem Wert sein.

Tabelle 1. Diagnostische Bedeutung antinukleärer Antikörper

| IF-Färbungsmuster | Natur des Antigens | Assoziierte Erkrankung |
|--------------------------|---|--|
| Homogen | dsDNA/Histone | SLE |
| Nuklear, membranartig | Laminine | SLE, Vaskulitis oder chronische Hepatitis |
| Gesprenkelt | RNP | SLE oder MCTD* |
| | Sm | SLE |
| | SS-A/SS-B | SLE oder Sjögren-Syndrom |
| | Scl-70 | Sklerodermie |
| Nukleolär | RNAP-I Pm-Scl RNA/wahrscheinlich U3 RNA | Sklerodermie |
| Zentromer/Kinetochor | innere und äußere Kinetochor-Schalen | CREST-Syndrom |
| DFS70 ¹⁵⁻¹⁸ | Dichtes, fein gesprenkeltes Muster (positiv bei ~10 % der Zellen oder relativ höheres Fluoreszenzsignal bei ~10 % der Zellen) | Negative Assozierung mit systemischen Autoimmunerkrankungen; bei atopischem Ekzem, androgenetischer Alopezie, Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) Syndrom, sympathischer Ophthalmie, Behcets-Krankheit und atypischer Netzhautdegeneration berichtet. |

*Sharp-Syndrom

Erkennbare zytoplasmatische Antikörper sind u. a. anti-mitochondriale Antikörper (AMA) und Antigene der glatten Muskulatur (anti-smooth muscle antibodies, ASMA). Bei einem AMA-Muster erscheint das Zytoplasma körnig, während das ASMA-Muster ein fibrilläres Netz der Färbung im Cytoplasma ist. Beide Muster sollten bezüglich ANA als negativ vermerkt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

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

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

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

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

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

ERWARTETE WERTE

Tests für nukleäre Antikörper werden für die Untersuchung auf SLE und gewisse andere immunologische Störungen verwendet. AMA kommen in über 90 % aller Fälle primärer biliarer Zirrhose und 3-11 % der Fälle chronischer Hepatitis vor. ASMA tritt bei der Mehrheit aller Fälle chronischer, aktiver Hepatitis auf.

Tabelle 2: Auftreten antinukleärer Antikörper (ANA), die durch indirekte Immunfluoreszenz in HEp-2-Zellen erkannt wurden

| Klinische Bedingungen | Anz. der Seren | % positive |
|--------------------------|----------------|------------|
| SLE | 12 | 100 |
| Subakut kutane LE (SCLE) | 7 | 86 |
| Sklerodermie | 6 | 100 |
| Rheumatoide Arthritis | 10 | 50 |
| Normale Kontrollen | 15 | 0 |

LEISTUNGSMERKMALE

Das ImmunoGlo™ Testsystem für Autoantikörper wurde mit einem anderen im Handel erhältlichen Fluoreszenzantikörpertest mit HEp-2-Zellen als Substrat verglichen. Der Vergleich schloss 15 Serumproben von normalen Testpersonen sowie Seren von Patienten mit SLE, subakutem kutanem Lupus erythematoses, Sklerodermie oder rheumatoider Arthritis ein. Die Seren wurden entsprechend den vom Hersteller empfohlenen Verfahren und Suchtestverdünnungen untersucht. Sie erbrachten vergleichbare Ergebnisse, die nachfolgend zusammengefasst sind:

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

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

IFA HEp-2 / DFS70 excisé

ENCART DE PRODUIT

IVD

| | | | |
|------------|----------|---------------------------------|-------------|
| REF | 1108 | Kit substrat HEp-2/DFS70 excisé | 60 mesures |
| REF | 1108-120 | Kit substrat HEp-2/DFS70 excisé | 120 mesures |
| REF | 1108-240 | Kit substrat HEp-2/DFS70 excisé | 240 mesures |

UTILISATION VISÉE

Test des anticorps par immunofluorescence indirecte (IF) pour la détection et la quantification des anticorps antinucléaires (AAN) dans le sang humain.

GENERALITES

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

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

Les Anticorps anti-muscle lisse (ASMA) se retrouvent en titre élevé (> 160) dans la majorité de cas d'hépatite active chronique et en titre intermédiaire (40-80) dans l'hépatite virale aiguë. De temps en temps ils peuvent se retrouver dans les cas de PBC où ils sont également trouvés dans des titres intermédiaires. La signification des titres de 20-40 est douteuse puisque ces valeurs peuvent se retrouver chez les individus normaux¹³⁻¹⁴.

Les anticorps anti-DFS70 produisent un motif d'immunofluorescence tacheté de fine densité au niveau nucléaire (DSF70) sur les cellules HEp-2. Ces auto-anticorps ciblent un antigène 70 kDa aussi connu sous le nom de LEDGF (facteur de croissance dérivé de l'épithélium de la lentille) ou de produit de gène psip1. Ils ont été initialement rapportés dans le sérum de patients avec des tests positifs aux AAN, mais aucune preuve clinique de maladie rhumatisante autoimmune systémique (MRAS). À l'origine, leur présence a été documentée chez les patients souffrant de certaines conditions inflammatoires et chez des individus « apparemment » en bonne santé¹⁵⁻¹⁷. Les anticorps DFS70 créent un motif pouvant être confondu avec le motif homogène (associé à l'ARN, les histones et les nucléosomes) ou finement tacheté associé aux MRAS. Sur les préparations fournies avec le kit, les types HEp-2 normaux (HEP2) sont mélangés à des HEp-2 dont le gène psip1 a été excisé (eHEP2) à un taux de 1 pour 9. Les HEP2 non modifiés détectent toutes les particularités des auto-anticorps. Les cellules eHEP2 sont capables de détecter toutes les spécificités des auto-anticorps sauf la DFS70 associée aux psip1 / LEDGF. Par conséquent, l'utilisation de ce produit apporte des fonctions supplémentaires pour permettre la discrimination précise de motifs homogènes, tachetés ou tachetés de fine densité. Ceci peut fournir plus d'informations aux laboratoires afin de pouvoir sélectionner les essais de confirmation.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Dans la méthode d'IF utilisée dans ce kit, le sérum du patient sera incubé sur des substrats de cellule HEp-2 afin de permettre la liaison des anticorps. Tous les anticorps qui ne sont pas liés sont enlevés au rinçage. Les anticorps liés de la classe IgG sont détectés par incubation du substrat avec un conjugué anti-humain IgG marqué à la fluorescéine. Les réactions sont observées sur un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. La présence d'AAN, d'ASMA et d'AMA est démontrée par un motif vert fluorescent de structures spécifiques dans les cellules. Une majorité des cellules présentes ont le gène psop1 excisé ce qui empêche la formation de sites de liaison de LEDGF dans ces cellules. Ceci permet la différenciation des motifs de réaction homogènes et tachetés des AAN par rapport aux motifs des DSF70¹⁸. Les titres (la réciproque de la plus forte dilution donnant une réaction positive) sont alors déterminés en testant les dilutions en série¹⁹.

INFORMATION PRODUIT

FR

Conservation et préparation des réactifs

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

Matériel fourni

Kit substrat HEp-2/DFS70 excisé

[REF] 1108 60 mesures

[REF] 1108-120 120 mesures

[REF] 1108-240 240 mesures

Substrat HEp-2 [SORB|SLD|12]

avec code à barres 12 puits de préparation de substrat HEP-/DFS70 excisé (5x

[REF] 1108, 10x [REF] 1108-120, 20x [REF] 1108-240)

Résolution positive aux AAN. Contient du sang humain.

1 x 0,5 ml [CONTROL]+[ANA-HOMO] Résolution positive d'anticorps DFS70. Contient du sang humain.

1 x 0,5 ml [CONTROL]+[DFS70]

1 x 0,5 ml [CONTROL]- Résolution négative. Contient du sang humain.

5 ml IgG-CONJ[FITC|EB] Conjugué IgG anti-humain FITC contenant du bleu d'Evans de contre-colorant. À protéger de la lumière. (1x [REF] 1108, 2x [REF] 1108-120, 3x [REF] 1108-240)

60 ml [BUF] Diluants tampons. (1x [REF] 1108, 1108-120, 2x [REF] 1108-240)

fioles [BUF|WASH] Tampon phosphate salé (TPS). Dissoudre chaque fiole dans 1 l d'eau distillée ou déminéralisée. (2x [REF] 1108, 1108-120, 3x [REF] 1108-240)

5 ml [MOUNTING|MEDIUM] Support de montage. Ne pas congeler. (1x [REF] 1108, 1108-120, 2x [REF] 1108-240)

12 par boîte [COVER|SLD] Lamelles. (1x [REF] 1108, 2x [REF] 1108-120, 4x [REF] 1108-240)

Composants en option

5 ml IgG-CONJ[FITC|EB]

Conjugué FITC anti-IgG humaines. Maintenir à l'abri de la lumière. [REF] 2100x.

1 ml EVANS

Contre-coloration bleu d'Evans. [REF] 2510*.

Symboles utilisés sur les étiquettes:

[LOT] Numéro de Lot

[REF] Numéro catalogue

[IVD] Utilisation à diagnostic in vitro

A utiliser avant

Température de stockage

Consulter les instructions d'emploi

Nombre de tests

Fabricant

Date de fabrication



*Danger. Peut provoquer le cancer. Se procurer les instructions avant utilisation. Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/ aerosols. EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage. Garder sous clef. Éliminer le contenu/récipient dans l'élimination des déchets approuvée

Matériel nécessaire mais non fourni

- Microscope à fluorescence Micropipette ou pipette Pasteur Pipettes sérologiques
- Bac à coloration pour le lavage des lames (type Coplin)
- Petits tubes (ex : 13 x 75 mm) et porte tubes
- Eau distillée ou déionisée
- Eprouvette graduée 1l

FR

- Flacon pour solution de lavage Serviettes en papier
- Chambre d'incubation

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*. Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), en anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite C (anti-HCV) et en anticorps dirigés contre les virus de l'immunodéficience humaine (anti-VIH1, anti-VIH2 et HTLV-I). Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage¹⁹.

ATTENTION – Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN₃). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

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

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

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

MODE OPÉRATOIRE

A. Dépistage

Sérum sanguin du patient à faire réagir sur des préparations avec HEp-2 faut diluer deux substrats dans une solution de dépistage à un taux de 1 part pour 40. Sur HEp-2, une réaction spécifique à un titre de 1 pour 40 ou plus est considérée comme positive.

1. Diluer le sérum de chaque patient à 1 : 40e (10 µl de sérum + 390 µl de diluant). Ne pas diluer les résolutions positives ou négatives. Sauvegarder les échantillons sanguins non dilués pour déterminer les titres d'anticorps si les tests de dépistage s'avèrent positifs.
2. Laisser les lames prendre la température du laboratoire pendant 10-15 minutes dans le sachet scellé. Sortir les lames avec précaution sans toucher le substrat
3. Numéroter les lames et les placer dans la chambre humidifiée avec des serviettes en papier mouillées pour éviter le dessèchement.
4. Inverser la pipette compte-goutte et appuyer doucement pour appliquer 1 goutte (environ 50 µl) de la résolution négative dans le puits n° 1. D'une manière similaire, appliquer 1 goutte de résolution positive 5.
5. A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur, déposer 1 goutte (environ 50 µl) de sérum dilué dans les trous restants. Eviter de déborder des trous.
6. Replacer le couvercle sur la chambre et incuber les lames 30 minutes à température ambiante.
7. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, rincer doucement avec une pipette contenant environ 10 ml de PBS ou rincer la lame dans un becher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Répéter les opérations avec toutes les lames.
8. Retirer une (les) lame(s) du bac de coloration. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. Déposer la lame dans la chambre d'incubation. Retourner les flacons doseurs de conjugué et déposer immédiatement 1 goutte (environ 50 µl) dans chaque trou.
9. Répéter les étapes **7 et 8** avec chaque lame.
10. Replacer le couvercle sur la chambre d'incubation et incuber 30 minutes à température ambiante.
11. Sortir une lame de la chambre d'incubation. En la tenant par un bord, plonger la lame dans un becher rempli de PBS pour éliminer l'excès de conjugué. Transférer dans un bac à coloration rempli de PBS pendant 10 minutes. Si un supplément de conjugué sans contre-coloration est utilisé (voir composé en option dans la Section Matériel Fourni), 2-3 gouttes de contre-coloration bleue d'Evans peuvent être ajoutée au lavage final. Répéter les opérations avec toutes les lames. REMARQUE : Un lavage incorrect peut altérer la morphologie des neutrophiles et

FR

augmenter le bruit de fond de fluorescence.

12. Retirer une lame du bac. Eliminer l'excès de PBS avec une serviette en papier. **Pour éviter de mettre à sec les puits, réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est encore humide.**
13. Déposer doucement **3 gouttes** de milieu de montage dans chaque puits et appliquer la lamelle couvre-lame. Ne pas appliquer de pression excessive et éviter les mouvements latéraux de la lamelle.
14. Répéter les étapes **12 et 13** avec chaque lame.
15. Observer la fluorescence spécifique à l'aide d'un microscope au grossissement X200 ou plus.

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

B. Détermination du titre par les dilutions en cascade

Un sang positif dans un test de dépistage peut être encore testé en suivant les étapes 5 à 13 pour déterminer la dissolution de dépistage appropriée au substrat. Chaque test doit inclure une résolution positive et une résolution négative. Faire des dilutions sérielles doublées commençant à 1 : 40e. La réciproque de la dilution la plus élevée produisant une réaction positive est le titre.

Préparation de Dilutions en Série commençant à 1:40

Pour créer des dilutions sérielles du sérum d'un patient de 1 : 40e à 1 : 1280, commencer par numérotter six éprouvettes de 1 à 6. Il est possible d'utiliser plus d'éprouvettes si une dilution finale supérieure est souhaitée. Ajouter 3,9 ml de diluant d'échantillonnage dans l'éprouvette 1 et 0,2 ml dans les éprouvettes 2 à 6. Pipetter 0,1 ml de sang non dilué de l'éprouvette 1 et mélanger soigneusement. Transférer 0,2 ml de l'éprouvette 1 à l'éprouvette 2 et mélanger soigneusement. Continuer à transférer 0,2 ml d'une éprouvette à la suivante après avoir mélangé pour obtenir les dilutions décrites dans le tableau suivant :

| Tubes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------------|
| Sérum | 0,1 ml | | | | | |
| | + | | | | | |
| Diluant Echantillon | 3,9 ml | 0,2 ml |
| | Ճ | Ճ | Ճ | Ճ | Ճ | Ճ |
| Transfer | 0,2 ml |
| Final dilution | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280, etc. |

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les deux résolutions négative et positive doivent être incluses avec chaque essai de dépistage. La résolution négative ne doit montrer aucune fluorescence spécifique des noyaux. La résolution positive aux AAN doit avoir une intensité de coloration de 2+ ou supérieure des noyaux avec un motif principalement homogène.

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

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

INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats doivent être rapportés comme négatifs, positifs ou, si le point limite de titre a été déterminé, positifs avec titre. Il est recommandé que les échantillons de patients démontrant des réactions fluorescentes spécifiques à la dilution à 1 : 40e soient des valeurs normales afin de prendre en compte les différences dans les systèmes de microscope, le personnel et les formations.

Ne lire que les champs contenant une coloration spécifique des cellules HEp-2 et les motifs observés pour les AAN, AMA et ASMA. Toutes les autres réactions doivent être rapportées comme négatives.

Il est possible de quantifier les ANA sur les cellules HEp-2. Les motifs de coloration nucléaire observables comprennent des motifs homogènes, périphériques, tachetés, nucléolaires et centromères. Ces motifs de coloration nucléaires sont décrits ci-dessous. Il peut y avoir un motif ou une combinaison de plusieurs motifs de coloration. Les combinaisons sont dues aux réactions de plusieurs antigènes nucléaires différents.

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

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

FR

Tacheté :

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

En corpuscules :

Les nucléoles se colorent comme de multiples éléments dans le noyau.

Centromère :

Grandes taches de nombre déterminé. Les antigènes ayant réagi s'isolent avec les chromosomes condensés des cellules en mitose.

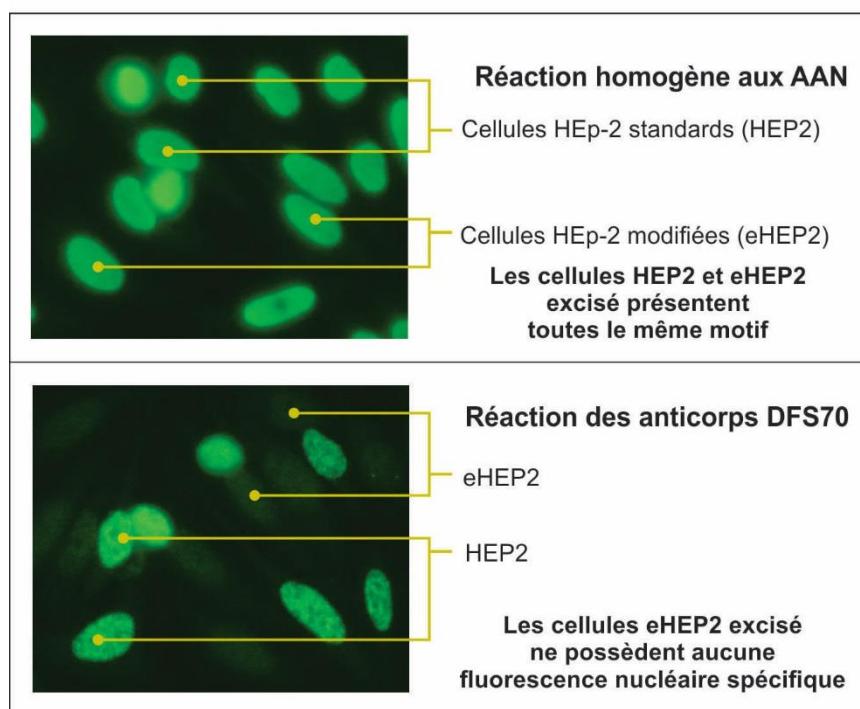
DFS70 :

HEp-2 (HEP2) normal : dans environ 10 % des cellules de chaque puits, on observe un motif tacheté de fine densité sur les noyaux interphasiques. On observe aussi une coloration associée à la chromatine sur les noyaux mitotiques.

HEp-2 (eHEP2) modifié : les 90 % approximatifs de HEp-2 restants contiennent le gène psip1 encodant l'antigène LEDGF excisé et ils ne produiront donc pas un motif similaire.

Si les 10 % des cellules HEp-2 ont une fluorescence plus intense correspondant au motif de réaction aux DFS70 et que le reste des cellules présente des motifs supplémentaires ou de taches fines au-dessus du seuil de démarcation, cela indique la présence de motifs variés. Une analyse plus approfondie de ces motifs est essentielle pour confirmer quelle autre spécificité d'anticorps est présente en plus du motif présenté par le DFS70 associé au LEDGF / psip1.

Figure 1. Réactions de référence



La spécificité de certains de ces anticorps provoquant les motifs de colorations susmentionnés peuvent être identifiés en effectuant des tests pour les anticorps à l'ADN et aux divers antigènes nucléaires solubles. Ces derniers peuvent avoir une importance pour le diagnostic comme listé dans le Tableau 1.

Tableau 1. Signification des anticorps antinucléaires pour le diagnostic

| Modèle de marquage | Nature de l'antigène | Maladie associée |
|---------------------------|---|--|
| Homogène | anti-dsDNA / Histones | LES |
| Membranaire nucléaire | Laminines | LES, vasculite ou hépatite chronique |
| Tacheté | RNP | LES ou MCM* |
| | Sm | LES |
| | anti-SS-A / anti-SS-B | LES ou Syndrome de Sjögren |
| | Scl-70 | Sclérodermie |
| Nucléolaire | ARN polymérase I Scléromyosite ARN / probablement ARN-U3 | Sclérodermie |
| Centromère / kinétochore | plaques internes et externes du kinétochore | Syndrome CREST |
| DFS70 ¹⁵⁻¹⁸ | Motif tacheté de fine densité (positif dans environ 10 % des cellules ou signal de fluorescence relativement plus élevé dans environ 10 % des cellules) | Association négative avec les maladies auto-immunes systémiques ; rapportée dans les cas de dermatite atopique, d'alopecie areata, de maladie de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), d'ophtalmie sympathique, de maladie de Behçet et de dégénération rétinienne atypique. |

* Maladies des tissus conjonctifs variées

Anticorps cytoplasmiques détectables y compris anticorps anti-mitochondrial (AMA) et anticorps anti-muscle lisse (ASMA). Dans un motif d'AMA, le cytoplasme semble granuleux, alors que le motif d'ASMA est un réseau fibrillaire de coloration sur l'ensemble du cytoplasme. Les deux motifs doivent être rapportés comme négatifs pour AAN.

LIMITES D'UTILISATION

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

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

L'appât conjugué anti-IgG FITC humaines fourni dans ce kit est principalement spécifique pour les chaînes lourdes mais a une légère activité chaîne légère. Il réagit principalement avec les anticorps de la classe des IgG mais peut à un degré moindre réagir avec des chaînes légères d'autres classes d'anticorps tels les IgM.

Un AAN positif, de par lui-même, ne doit pas être considéré comme un diagnostic de LES. Ils se retrouvent également chez les patients présentant d'autres maladies du tissu conjonctif et certaines drogues telles que la procaïnamide et l'hydralazine peuvent induire un AAN positif¹. D'autre part, les sérums de patients présentant des cancers et des maladies infectieuses peuvent également avoir un AAN positif²⁰.

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

VALEURS PRÉVUES

Les tests pour les anticorps antinucléaires sont utilisés pour dépister la LES et certains autres désordres immunologiques. Les AMA se rencontrent dans plus de 90 % des cas de cirrhose biliaire primaire et dans 3 à 10 % des cas d'hépatites chroniques. L'ASMA se rencontre dans la majorité des cas d'hépatites actives chroniques.

Tableau 2 : Incidence d'anticorps antinucléaires (AAN) détectés par immunofluorescence indirecte sur HEp-2 cellules

| Condition clinique | | Nombre de sanguins | % Positif |
|--|--|---------------------------|------------------|
| LES | | 12 | 100 |
| Lupus érythémateux cutané subaigu (LECS) | | 7 | 86 |
| Sclérodermie | | 6 | 100 |
| Arthrite rhumatoïdale | | 10 | 50 |
| Résolutions normales | | 15 | 0 |

PERFORMANCES

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

Comparaison de kits utilisant le substrat cellules Hep-2 pour la détection des anticorps antinucléaires.

| État clinique | Nombre de sérum | % Positif | |
|----------------------|------------------------|------------------|--------------|
| | | Immco | Autre |
| SLE | 12 | 100 | 100 |
| LECS | 7 | 85 | 85 |
| Sclérodermie | 6 | 100 | 100 |
| Arthrite rhumatoïde | 10 | 50 | 30 |
| Contrôles normaux | 15 | 0 | 0 |

IFA HEp-2 / DFS70 inattivato

FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

IVD

| | | | |
|-----|----------|--|--------------------|
| REF | 1108 | Kit per substrato HEp-2/DFS70 inattivato | 60 determinazioni |
| REF | 1108-120 | Kit per substrato HEp-2/DFS70 inattivato | 120 determinazioni |
| REF | 1108-240 | Kit per substrato HEp-2/DFS70 inattivato | 240 determinazioni |

FINALITA' D'USO

Test per anticorpo a immunofluorescenza indiretta (IFA) per il rilevamento e la quantizzazione di anticorpi anti-nucleari (ANA) in siero umano.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Gli **anticorpi antinucleari (ANA)**, individuati con la tecnica di immunofluorescenza indiretta, sono utili nella diagnosi dei disturbi del tessuto connettivo quali il lupus eritematoso sistemico (LES), la malattia mista del tessuto connettivo, la sindrome di Sjögren e la sclerodermia¹⁻⁵. Gli ANA compaiono in circa il 95% dei pazienti affetti da LES e in pazienti con altri disturbi del tessuto connettivo. Gli ANA possono essere riscontrati anche in caso di altre patologie quali l'epatite cronica attiva e la cirrosi biliare primitiva⁶⁻⁸.

Gli **anticorpi antimitocondriali (AMA)**, sono presenti in circa il 90% dei casi di cirrosi biliare primitiva, nel 3-11% dei pazienti con epatite cronica attiva, mentre sono assenti in pazienti con atresia biliare extraepatica o affetti da altre epatopatie. La presenza universale di anticorpi antimitocondriali in caso di cirrosi biliare primitiva e la virtuale assenza nella colestasi extraepatica, rendono l'identificazione di considerevole valore per la diagnosi differenziale⁶⁻¹².

Gli **anticorpi antimuscolo liscio (ASMA)** in titoli elevati (>160), compaiono nella maggior parte dei casi di epatite cronica attiva e in titoli intermedi (40-80) nei casi di epatite virale acuta. Occasionalmente, possono essere presenti con epatite biliare primitiva anche in titoli intermedi. La significatività dei titoli di 20-40 è incerta dato che questi valori possono essere riscontrati in individui normali¹³⁻¹⁴.

Gli **anticorpi anti-DFS70** producono un pattern di immunofluorescenza nucleare a chiazze (DSF70) su cellule HEp-2. Questi autoanticorpi puntano ad un antigene 70 kDa conosciuto anche come LEDGF (fattore di crescita derivato dall'epitelio lenticolare) o prodotto genico psip1. Questi sono stati inizialmente trovati nel siero di pazienti con test ANA positivi ma senza alcuna evidenza di malattia reumatica autoimmune sistemica (SARD). La loro presenza è stata inizialmente documentata in pazienti con alcune condizioni infiammatorie e persone 'apparentemente' sane¹⁵⁻¹⁷. Gli anticorpi DFS70 producono un pattern che può essere preso per omogeneo (associato a DNA, istoni e nucleosomi) o pattern macchiato con SARD. Sui vetrini forniti con questo kit, le cellule HEp-2 standard (HEP2) sono mischiare con eHEp-2 con gene psip1 inattivato (KO/"knock out") in rapporto 1:9. Le cellule HEP2 sono in grado di rilevare tutte le specie di autoanticorpi ANA. Le cellule eHEP2 sono in grado di rilevare tutte le specie di autoanticorpi eccetto DFS70 associato a psip1/LEDGF. L'uso di questo prodotto consente ulteriore funzionalità per aiutare la discriminazione accurata di pattern omogenei, granulari e finemente granulari. Questo può fornire al laboratorio più informazioni per selezionare dosaggi obbligatori.

PRINCIPI DELLA METODICA

Nel metodo IF indiretto usato in questo kit, il siero del paziente è incubato su substrati di cellule HEp-2 che consentono il legame di anticorpi. Tutti gli anticorpi non legati sono rimossi col risciacquo. Gli anticorpi legati della classe IgG sono rilevati per incubazione del substrato con coniugato IgG antiumano di fluoresceina. Le reazioni sono osservate con un microscopio fluorescente dotato di appositi filtri. La presenza di ANA, ASMA e AMA è dimostrata da una fluorescenza mela verde di strutture specifiche nelle cellule. Una maggioranza di cellule presenti hanno il gene psip1 inattivato il quale previene la formazione di siti di collegamento LEDGF in queste cellule. Questo consente la differenziazione di pattern a reazione macchiata e omogenei di ANA dai pattern DSF70¹⁸. I titoli (il reciproco della diluizione più alta che produce una reazione positiva) sono determinati poi testando diluizioni seriali¹⁹.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

Conservazione e preparazione

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

IT

Materiali forniti

Kit per substrato HEp-2 / DFS70 inattivato

[REF] 1108 60 determinazioni

[REF] 1108-120 120 determinazioni

[REF] 1108-240 240 determinazioni

Substrato HEp-2 [SORB|SLD|12] Vetrino con codice a barra a 12 pozzetti con substrato HEp-2/DFS70 inattivato (5x [REF] 1108, 10x [REF] 1108-120, 20x [REF] 1108-240)

1 x 0,5 ml [CONTROL|+|ANA-HOMO] Controlli positivi ANA. Contiene siero umano.

1 x 0,5 ml [CONTROL|+|DFS70] Controllo positivo anticorpi DFS70. Contiene siero umano.

1 x 0,5 ml [CONTROL|-] Controllo negativo. Contiene siero umano.

5 ml [IgG-CONJ|FITC|EB] Coniugato IgG FITC anti-umano contenente il colorante di contrasto Evan's Blue. Proteggere dalla luce. (1x [REF] 1108, 2x [REF] 1108-120, 3x [REF] 1108-240)

60 ml [BUF] Diluenti tamponati. (1x [REF] 1108, 1108-120, 2x [REF] 1108-240)

fiale [BUF|WASH] Soluzione salina con tampone fosfato (PBS). Sciogliere ogni fiala in 1L di acqua distillata o deionizzata. (2x [REF] 1108, 1108-120, 3x [REF] 1108-240)

5 ml [MOUNTING|MEDIUM] Mezzo di montaggio. Non congelare. (1x [REF] 1108, 1108-120, 2x [REF] 1108-240)

12 per confezione [COVER|SLD] Vetrini coprioggetti. (1x [REF] 1108, 2x [REF] 1108-120, 4x [REF] 1108-240)

Componenti opzionali

5 ml [IgG-CONJ|FITC|EB] Coniugato FITC anti IgG umane. Proteggere dalla luce. [REF] 2100x.

1 ml [EVANS] Colorante di contrasto Blu di Evans. [REF] 2510*.

Simboli utilizzati sulle etichette

[LOT] Codice del lotto

[REF] Numero di catalogo

[IVD] Per uso diagnostico *in vitro*

Utilizzare entro

Temperatura di conservazione

Consultare le istruzioni per l'uso

Numero di test

Fabbricante

Data di fabbricazione



*Pericolo. Può provocare il cancro. Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. Conservare sotto chiave. Smaltire il prodotto/recipiente nello smaltimento dei rifiuti approvato.

Materiali necessari non forniti

- Microscopio a fluorescenza
- Micropipetta o pipetta Pasteur
- Pipette sierologiche

IT

- Vaschetta per colorazione (ad es. vaschetta Coplin)
- Provette piccole pertest (ad es. 13 x 75 mm) e rack per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Contenitore da 1 litro
- Flacone di lavaggio
- Salviette di carta
- Camera umida per l'incubazione

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

ATTENZIONE – L'azide sodica (NaN_3) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metallici altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveneni.

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

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

PROCEDURA

Metodo del test

A. Screening

Il siero del paziente che deve reagire sui vetrini con substrato HEp-2 deve essere diluito usando la diluizione di screening 1:40. Sull'HEp-2 una reazione specifica 1:40 o titolo superiore è considerata positiva.

1. Sciogliere il siero del paziente 1:40 (siero 10 μl + diluente 390 μl). Non diluire controlli positivo e negativo. Mettere da parte i sieri non diluiti per determinare i titoli anticorpali se i test di screening sono risultati positivi.
2. Lasciare che le buste contenenti i vetrini raggiungano la temperatura ambiente per 10-15 minuti. Rimuovere con attenzione il vetrino senza venire in contatto con il substrato.
3. Contrassegnare i vetrini e disporli nella camera umida sul cui piano interno saranno state poste delle salviette di carta inumidite con acqua per prevenire l'essiccazione.
4. Invertire la fiala contagocce e gentilmente strizzare per applicare 1 goccia (ca. 50 μl) del controllo negativo al pozzetto nr. 1. Applicare allo stesso modo 1 goccia di controllo positivo ANA al pozzetto nr. 2. Non riempire eccessivamente i pozzetti.
5. Usando una micropipetta o pipetta Pasteur, applicare 1 goccia di siero diluito del paziente (circa 50 μl) negli altri pozzetti. Evitare di riempire eccessivamente i pozzetti.
6. Posizionare il coperchio sulla camera umida e incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente.
7. Rimuovere il vetrino dalla camera umida, reggerlo per l'estremità e irrorare delicatamente con circa 10 ml di PBS usando una pipetta, oppure sciacquare il vetrino in un recipiente contenente PBS. Non usare flaconi di lavaggio. Trasferire immediatamente il vetrino in una vaschetta Coplin di lavaggio e attendere per 10 minuti. Ripetere la procedura per tutti gli altri vetrini.
8. Rimuovere il/i vetrino/i dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso e collocarlo nella camera umida. Applicarne 1 goccia (circa 50 μl) di Coniugato in ciascun pozzetto.
9. Ripetere le fasi **7 e 8** per ciascun vetrino.
10. Riposizionare il coperchio sulla camera umida e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
11. Rimuovere il vetrino dalla camera umida, reggerlo per l'estremità e immergerlo in un recipiente contenente PBS per rimuovere il coniugato in eccesso. Lasciare il/i vetrino/i per 10 minuti in una vaschetta Coplin riempita con PBS. Nel caso venga usato un coniugato opzionale, privo di colorante di contrasto (vedere componenti opzionali nella

IT

sezione Materiali Forniti), possono essere aggiunte 2-3 gocce di Blu di Evans nel lavaggio finale. Ripetere la procedura per i restanti vetrini. NOTA: Un lavaggio inadeguato può causare un aumento nella fluorescenza di fondo.

12. Rimuovere il vetrino dalla vaschetta Coplin. Asciugare il vetrino su carta assorbente per rimuovere la soluzione PBS in eccesso. **Per prevenire l'essiccazione, procedere immediatamente alla fase successiva mentre il vetrino è ancora umido.**
13. Montare il vetrino coprioggetto applicando **3 gocce** di soluzione di montaggio uniformemente sul coprioggetto e posizionarlo sopra il vetrino. Evitare di esercitare una pressione eccessiva e gli spostamenti laterali del vetrino coprioggetto.
14. Ripetere le fasi 12 e 13 per ciascun vetrino.
15. Esaminare la fluorescenza specifica mediante microscopia a fluorescenza con ingrandimento 200x o superiore.

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

B. Determinazione Endpoint (titolazione)

Un siero risultato positivo al test di screening può essere analizzato ulteriormente per determinare la diluizione di screening appropriata per il substrato seguendo i passaggi da 5 a 13. Ogni esecuzione del test deve includere il controllo negativo e positivo. Preparare le diluizioni dupliche seriali del siero iniziando con 01:40. Il reciproco della diluizione più alta che produce una reazione positiva è il titolo.

Preparazione delle Diluizioni Seriali a partire da 1:40

Per creare diluizioni seriali di un campione di paziente da 1:40 a 1:1280, iniziare numerando sei provette da 1 a 6. Altre provette possono essere usate se si desidera una diluizione finale più alta. Aggiungere 3,9 ml di diluente campione alla provetta 1 e 0,2 ml alle provette dalla 2 alla 6. Pipettare 0,1 ml di siero non diluito nella provetta 1 e miscelare accuratamente. Trasferire 0,2 ml dalla provetta 1 alla provetta 2 e miscelare accuratamente. Continuare a trasferire 0,2 ml da una provetta a quella successiva dopo la miscelazione per produrre le diluizioni previste come indicato nella seguente tabella:

| Provette | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------|
| Siero | 0,1 ml | | | | | |
| | + | | | | | |
| Diluente tamponato | 3,9 ml | 0,2 ml |
| | ↗ | ↗ | ↗ | ↗ | ↗ | ↗ |
| Trasferimento | 0,2 ml | |
| Diluizione finale | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 etc. |

CONTROLLO DI QUALITÀ

Ogni esecuzione del test deve includere, sia un siero di controllo positivo, sia un siero di controllo negativo. Il controllo negativo non mostra fluorescenza specifica dei nuclei. Il controllo positivo ANA dovrebbe avere un'intensità di colorazione di 2+ o maggiore dei nuclei con pattern prevalentemente omogeneo.

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

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

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati devono essere negativi, positivi o, se viene rilevato titolo a punto finale, positivo con titolo. Si consiglia che i campioni del paziente che dimostrano reazioni di fluorescenza specifica ad una diluizione di 1:40 siano valori normali da considerare per differenze in sistemi microscopici, personale e formazione.

Campi a sola lettura che contengono colorazione specifica delle cellule HEp-2 e i pattern osservati per ANA, AMA e ASMA. Tutte le altre reazioni devono essere negative.

ANA può essere quantificato sulle cellule HEp-2. I pattern di colorazione nucleare osservabili sono omogenei, periferali

IT

(bordo), macchiati, nucleolari e centromeri. Questi pattern con macchie nucleari sono descritti di seguito. Possono essere uno o una combinazione di più pattern di colorazione. Gli ultimi sono il risultato di reazioni di diversi antigeni nucleari.

| | |
|-----------------------------|---|
| Omogeneo: | Fluorescenza uniforme dell'intero nucleo con pattern di colorazione diffuso. |
| Membranoso nucleare: | Fluorescenza accentuata della membrana nucleare con intensità di fluorescenza del nucleoplasma diminuente verso il centro del nucleo. |
| Macchiato: | Fluorescenza a macchie tondeggianti da granulari a finemente granulari nell'intero nucleo. |
| Nucleolare: | Fluorescenza deinucleoli come corpi solidi multipli all'interno del nucleo. |
| Centromericco: | Fluorescenza puntiforme di numero finito. L'antigene reattivo è segregato con i cromosomi condensati in cellule in fase mitotica ⁵ . |
| DFS70: | Cellule HEp-2 standard (HEP2): Nel 10% di cellule di ogni pozzetto, un pattern con macchie fini viene rilevato sul nucleo interfase. La colorazione associata alla cromatina è vista su nuclei mitotici. Cellule HEp-2 ingegnerizzate (eHEP2): Il restante 90% di cellule HEp-2 presenta il gene psip1, che codifica l'antigene LEDGF, inattivato e, di conseguenza, non produrrà un pattern simile. Se il 10% delle cellule HEp-2 presenza fluorescenza più luminosa corrispondente al pattern DFS70 e il resto delle cellule presenta altri pattern o segni di macchie fini superiori al cut-off, si ha la presenza di pattern misti. L'analisi più profonda di tali pattern è fondamentale per confermare quale altra specificità degli anticorpi è presente oltre al pattern DFS70 associato a LEDGF/psip1. |

La specificità di alcuni anticorpi che presentano i pattern di colorazione su menzionati può essere ulteriormente identificata da test per anticorpi a nDNA e a vari antigeni nucleari estraibili. Questi possono essere di importanza diagnostica come indicato nella Tabella 1.

Tabella 1. Importanza diagnostica di anticorpi antinucleari

| Pattern di colorazione IF | Natura dell'antigene | Malattia associata |
|---------------------------|---|--|
| Omogeneo | dsDNA/istoni | LES |
| Membranoso nucleare | Laminina | SLE, vasculite o epatite cronica |
| Macchiato | RNP | SLE o MCTD* |
| | Sm | LES |
| | SS-A/SS-B | LES o sindrome di Sjögren |
| | Scl-70 | Sclerodermia |
| Nucleolare | RNAP-I | Sclerodermia |
| | Pm-Scl | |
| | RNA/probabilmente U3 | |
| | RNA | |
| Centromericco/cinetocoro | piastre interne ed esterne di cinetocoro | Sindrome di CREST |
| DFS70 ¹⁵⁻¹⁸ | pattern con macchie fini (positivo nel 10% di cellule o segnale a fluorescenza relativamente più alta nel 10% di cellule) | Associazione negativa con malattie autoimmuni sistemiche; rilevato in dermatite atopica, alopecia aerata, malattia di Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), oftalmia simpatetica, malattia di Behcet e degenerazione retinale atipica. |

* Malattia del tessuto connettivo misto

Gli anticorpi citoplasmatici rilevabili includono anticorpi anti-mitocondriali (AMA) e anticorpi anti muscolo liscio (ASMA). In un pattern AMA il citoplasma sembra granulare, mentre il pattern ASMA è una rete fibrillare di colorazione in tutto il citoplasma. Entrambi i pattern devono essere riferiti negativi per l'ANA.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

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

Nel caso in cui in un siero siano presenti due o più anticorpi reattivi con lo stesso substrato, può verificarsi

IT

un'interferenza nel rilevamento per immunofluorescenza. L'interferenza può risultare in mancata individuazione degli ANA o in soppressione del titolo se l'anticorpo interferente ha un titolo più alto di quello degli ANA. Tutte le reazioni degli ANA dovrebbero essere refertate.

Il Coniugato FITC anti-IgG umano caprino fornito in questo kit è prevalentemente specifico per le catene pesanti ma presenta anche una certa attività con le catene leggere. Reagisce maggiormente con gli autoanticorpi della classe IgG, ma può, in misura inferiore, reagire con le catene leggere di altre classi, ad esempio le IgM.

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

Per la formulazione della diagnosi i medici dovrebbero pertanto valutare i risultati positivi dei test di immuno-fluorescenza indiretta insieme ai risultati di altre analisi di laboratorio e alle condizioni cliniche del paziente.

VALORI ATTESI

I test per anticorpi nucleari sono usati per lo screening di LES e alcune malattie immunologiche. Gli AMA si presentano in più del 90% di casi di cirrosi biliare primaria e 3-11% di casi di epatite cronica. Gli ASMA si presentano nella maggioranza dei casi di epatite attiva cronica.

Tabella 2: Incidenza di anticorpi antinucleari (ANA) rilevati da immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2

| Condizione clinica | Nr. di siero | % positivi |
|----------------------------|--------------|------------|
| LES | 12 | 100 |
| LE cutaneo subacuto (SCLE) | 7 | 86 |
| Sclerodermia | 6 | 100 |
| Artrite reumatoide | 10 | 50 |
| Controlli normali | 15 | 0 |

PERFORMANCE DEL TEST

Il Test di Rilevazione di Autoanticorpi in Immunofluorescenza ImmunoGlo™ è stato confrontato con un test analogo in fluorescenza disponibile in commercio che usa come substrato cellule epiteliali HEp-2. La comparazione ha incluso 15 campioni di siero da soggetti normali oltre a sieri di pazienti con diagnosi di LES, di lupus eritematoso cutaneo subacuto, scleroderma o artrite reumatoide. I sieri sono stati testati secondo la procedura e le diluizioni di screening consigliate dal produttore.

I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono:

Comparazione di Kit che utilizzano cellule epiteliali HEp-2 come Substrato per l'Individuazione di Anticorpi Antinucleari

| Condizione Clinica | N. di Sieri | % Positiva | |
|----------------------------|-------------|------------|-------|
| | | Immco | Altri |
| LES | 12 | 100 | 100 |
| LE cutaneo subacuto (SCLE) | 7 | 85 | 85 |
| Scleroderma | 6 | 100 | 100 |
| Artrite reumatoide | 10 | 50 | 30 |
| Controlli normali | 15 | 0 | 0 |

IFA HEp-2 / DFS70 inativado BULA

IVD

| | | | |
|-----|----------|--|-------------------|
| REF | 1108 | Kit de substrato HEp-2/DFS70 inativado | 60 determinações |
| REF | 1108-120 | Kit de substrato HEp-2/DFS70 inativado | 120 determinações |
| REF | 1108-240 | Kit de substrato HEp-2/DFS70 inativado | 240 determinações |

APLICAÇÃO

Teste de anticorpos por imunofluorescência indireta (IFA) para deteção e quantificação de anticorpos antinucleares (ANA) no soro humano.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os Anticorpos Anti-nucleares (ANA), detectados por imunofluorescência indirecta, auxiliam o diagnóstico de patologias do tecido conjuntivo incluindo Lúpus eritematoso sistémico (LES), doença mista do tecido conjuntivo. Síndrome de Sjögren e esclerodermia¹⁻⁵. Os ANA apresentam-se em cerca de 95% dos doentes LES bem como em doentes com outras doenças do tecido conjuntivo. Os ANA também se podem apresentar noutras patologias tais como hepatite crónica activa e cirrose biliar primária⁶⁻⁸.

Os Anticorpos Anti-mitocondriais (AMA) apresentam-se em mais de 90% dos casos com cirrose biliar primária, em 3 a 11% dos doentes com hepatite crónica activa e estão ausentes nos doentes com obstrução biliar extra-hepática e noutras doenças do fígado. A presença universal de anticorpos anti-mitocondriais na cirrose biliar primária e a sua ausência virtual em icterícia extra-hepática torna a sua detecção de valor considerável no diagnóstico diferencial⁶⁻¹².

Os Anticorpos Anti-músculo liso (ASMA) em alta título (>160) apresentam-se na maioria dos casos de hepatite crónica activa e em títulos intermédios (40-80) em hepatite viral aguda. Ocasionalmente poderão apresentar-se em casos de cirrose biliar primária na qual também se encontram em titulações intermédias. A importância de títulos de 20-40 é ambígua visto que estes títulos podem apresentar-se em indivíduos normais¹³⁻¹⁴.

Os anticorpos anti-DFS70 produzem um padrão nuclear de imunofluorescência pontilhado fino denso (DSF70) em células HEp-2. Estes autoanticorpos visam um antígeno 70 kDa, também conhecido como fator de crescimento derivado do epitélio de cristalino (Lens Epithelium Derived Growth Factor, LEDGF). Inicialmente, foi relatado que ocorriam em soros de pacientes com testes positivos para ANA, mas sem evidência clínica de doença reumática autoimune sistémica (DRAS). A sua presença foi inicialmente documentada em pacientes com determinadas doenças inflamatórias e indivíduos "aparentemente" saudáveis¹⁵⁻¹⁷. Os anticorpos DFS70 produzem um padrão que pode ser confundido como homogéneo (associado ao DNA, histones e nucleossomas) ou padrão pontilhado fino associado a DRAS. Nas lâminas que receberam este kit, HEp-2 padrão (HEP2) são misturados com HEp-2 com o gene psip1 inativado (eHEP2) numa proporção 1:9. As células HEP2 são capazes de detetar todas as especificidades de autoanticorpos ANA. As células eHEP2 são capazes de detetar todas as especificidades de autoanticorpos exceto DFS70 associados a psip1/FCDEC. Portanto, a utilização deste produto oferece uma funcionalidade adicional para ajudar na discriminação precisa de padrões homogéneos, pontilhados e pontilhados finos densos. Assim, o laboratório poderá obter mais informações para selecionar ensaios de confirmação apropriados.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

No método de IF indireta utilizado neste kit, são incubados soros de pacientes em substratos de células HEp-2 para permitir a ligação de anticorpos. Os anticorpos não ligados serão removidos por lavagem. Os anticorpos ligados da classe IgG são detetados por incubação do substrato com conjugado IgG anti-humano marcado com fluoresceína. As reações são observadas num microscópio de fluorescência equipado com filtros apropriados. A presença de ANA, ASMA e AMA é demonstrada por uma fluorescência verde maçã de estruturas específicas nas células. A maioria das células presentes tem o gene psip1 inativado, o que evita a formação de locais de ligação do LEDGF nestas células. Isso permite estabelecer uma diferenciação entre padrões de reação pontilhados e homogéneos de ANA e padrões DSF70. Em seguida, os títulos (recíprocos à diluição mais elevada fornecendo uma reação positiva) são determinados testando diluições em série¹⁹.

INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO

Conservação e preparação

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

PT

a temperatura ambiente.

Materiais fornecidos

Kit de substrato HEp-2/DFS70 inativado

| | | |
|-------|----------|-------------------|
| [REF] | 1108 | 60 determinações |
| [REF] | 1108-120 | 120 determinações |
| [REF] | 1108-240 | 240 determinações |

| | | |
|--------------------|----------------------|--|
| Substrato de Hep-2 | [SORB SLD 12] | Lâmina de substrato HEp-2/DFS70 inativado com 12 poços (5x [REF] 1108, 10x [REF] 1108-120, 20x [REF] 1108-240) |
| 1 x 0,5 ml | [CONTROLO+ ANA-HOMO] | Controlo positivo para ANA. Contém soro humano. |
| 1 x 0,5 ml | [CONTROLO+ DFS70] | Controlo positivo para anticorpos DFS70. Contém soro humano. |
| 1 x 0,5 ml | [CONTROLO -] | Controlo negativo. Contém soro humano. |
| 5 ml | [IgG-CONJ FITC EB] | Conjugado FITC IgG anti-humano com corante de contraste azul de Evans. Proteger da luz. (1x [REF] 1108, 2x [REF] 1108-120, 3x [REF] 1108-240) |
| 60 ml | [BUF] | Diluentes tamponados. (1x [REF] 1108, 1108-120, 2x [REF] 1108-240) |
| frascos | [BUF WASH] | Soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS). Dissolva cada frasco em 1L de água destilada ou deionizada. (2x [REF] 1108, 1108-120, 3x [REF] 1108-240) |
| 5 ml | [MOUNTING MEDIUM] | Meio de montagem. Não congelar. (1x [REF] 1108, 1108-120, 2x [REF] 1108-240) |
| 12 por caixa | [COVER SLD] | Lamelas. (1x [REF] 1108, 2x [REF] 1108-120, 4x [REF] 1108-240) |

Componentes opcionais

| | | |
|------|-----------------|---|
| 5 ml | [IgG-CONJ FITC] | Conjugador de IgG anti-humana IgG com FITC. Proteger da luz. [REF] 2100x. |
| 1 ml | [EVANS] | Contracorante azul de Evans. [REF] 2510. |

Símbolos utilizados nos rótulos:

[LOT] Número de lote

[REF] Número de catálogo

[IVD] Utilização diagnóstica *in vitro*

 Utilização por

 Temperatura de armazenamento

 Consulte as instruções de utilização

 Número de testes

 Fabricante

 Data de fabricação



*Perigo. Pode provocar cancro. Pedir instruções específicas antes da utilização. Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico. Usar luvas de proteção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. Armazenar em local fechado à chave. Armazenar em local fechado à chave. Eliminar o conteúdo/recipiente em eliminação de resíduos aprovada.

Material necessário mas não fornecido

- Microscópio de fluorescência
- Micropipeta ou pipeta de Pasteur
- Pipetas serológicas
- Recipiente de coloração (ex: Coplin)

PT

- Tubos de ensaio pequenos (ex.: 13 x 75 mm) e suportes para tubos de ensaio
- Água destilada ou desionizada
- Recipiente de 1 litro
- Frasco de lavagem
- Toalhetes de papel
- Câmara de incubação

AVISOS E PRECAUÇÕES

Para uso em diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados para HbsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I e deram resultado negativo nos testes requeridos pela FDA. Todas as amostras de soro humano e produtos de origem humana devem ser tratados como sendo potencialmente perigosos, independentemente da sua origem. Devem-se respeitar as boas práticas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação destes materiais¹⁹.

AVISO: A azida de sódio (NaN_3) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação dessas azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director de laboratório ou um Centro Anti-Venenos.

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

COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

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

PROCEDIMENTO

Método do teste

A. Despiste

Os soros de pacientes cuja reação será analisada em lâminas com substrato de HEp-2 devem ser diluídos utilizando diluição de deteção 1:40. Numa reação específica de HEp-2, um título 1:40 ou superior é considerado positivo.

1. Dilua o soro de cada paciente 1:40 (10 µl de soro + 390 µl de diluente). Não dilua controlos positivos nem negativos. Guarde os soros não diluídos para determinar títulos de anticorpos se os testes de deteção forem positivos.
2. Deixe que as bolsas com as lâminas de substrato estabilizem à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. Retire as lâminas com atenção sem tocar no substrato.
3. Rotule as lâminas e coloque-as na câmara de incubação revestida com toalhetes de papel humedecidos com água para evitar a secagem.
4. Inverta o frasco conta-gotas e aperte suavemente de modo a aplicar 1 gota (aproximadamente 50 µl) do controlo negativo no poço n.º 1. De igual modo, aplique uma gota de controlo positivo ADA no poço n.º 2. Evite encher demasiado os poços.
5. Com uma micropipeta ou pipeta de Pasteur, deite 1 gota do soro diluído do doente (cerca de 50 µl) nos outros poços. Evite encher demasiado os poços.
6. Coloque a tampa na câmara de incubação e incube as lâminas 30 minutos à temperatura ambiente.
7. Retire a lâmina da câmara de incubação. Segure na lâmina pela extremidade e lave com cerca de 10 ml de PBS usando uma pipeta, ou lave a lâmina numa proveta com PBS. Não use o frasco de lavagem. Transfira imediatamente a lâmina para o recipiente de Coplin e lave 10 minutos. Repita a operação em todas as lâminas restantes.
8. Retire a(s) lâmina(s) do recipiente de Coplin. Passe o bordo da lâmina num toalhete de papel para eliminar o excesso de PBS.
- Coloque a lâmina na câmara de incubação. Inverta imediatamente o frasco conta-gotas do Conjugado e aperte ligeiramente para deitar 1 gota (aproximadamente 50 µl) em cada poço.
9. Repita os passos 7 e 8 em cada lâmina.
10. Coloque a tampa na câmara de incubação. Incube por 30 minutos à temperatura ambiente.

PT

11. Retire uma lâmina da câmara de incubação. Segure na lâmina numa ponta e mergulhe-a num recipiente com PBS para eliminar o excesso de conjugado. Coloque a(s) lâmina(s) num recipiente de coloração com PBS durante 10 minutos. Se optar por usar conjugado sem contrastante (consultar componentes opcionais na secção Materiais fornecidos), poderá adicionar 2 a 3 gotas de contrastante azul de Evans à lavagem final. Repita a operação nas lâminas restantes. NOTA: Uma lavagem incorrecta pode levar a um aumento da fluorescência de fundo.
12. Retire a lâmina do recipiente de coloração. Passe a aresta da lâmina num toalhete de papel para eliminar o excesso de PBS. **Para evitar que a lâmina seque, salte imediatamente ao passo seguinte enquanto a lâmina ainda está húmida.**
13. Monte a lamela aplicando **3 gotas** de Meio de Montagem uniformemente na lamela e colocá-la sobre a lâmina. Não faça muita pressão e evite o deslizamento lateral da lamela.
14. Repita os passos 12 e 13 em cada lâmina.
15. Examine a fluorescência específica com microscópio de fluorescência com aumento de 200x ou mais.

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

B. Determinação final (titulação)

Um soro positivo no teste de deteção pode ser novamente testado seguindo os passos 5 a 13 para determinar a diluição de deteção apropriada para o substrato. Cada série de testes deve incluir os controlos positivos e negativos. Faça duplas diluições em série começando em 1:40. O recíproco da diluição mais elevada que produz uma reação positiva é o título.

Preparação de diluições em série começando em 1:40

Para criar diluições em série da amostra de um paciente de 1:40 a 1:1280, comece numerando seis tubos de 1 a 6. É possível utilizar mais tubos caso se pretenda obter uma diluição final superior. Adicione 3,9 ml de diluente de amostras ao tubo 1 e 0,2 ml aos tubos 2 a 6. Pipete 0,1 ml de soro não diluído no tubo 1 e misture bem. Transfira 0,2 ml do tubo 1 para o tubo 2 e misture bem. Continue a transferir 0,2 ml de um tubo para o seguinte após misturar para produzir as diluições representadas na seguinte tabela:

| Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------|
| Soro | 0,1 ml | | | | | |
| | + | | | | | |
| Diluente tamponado | 3,9 ml | 0,2 ml |
| | ↙ | ↙ | ↙ | ↙ | ↙ | ↙ |
| Transferir | 0,2 ml | |
| Diluição final | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 etc. |

CONTROLO DE QUALIDADE

Deve incluir tanto um controlo positivo quanto um controlo negativo com cada série de testes. O controlo negativo não deve mostrar fluorescência específica dos núcleos. O controlo positivo ANA deve ter uma intensidade de coloração dos núcleos 2+ ou superior com um padrão predominantemente homogéneo.

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

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

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

determinado, positivos com título. Recomenda-se que as amostras de pacientes que demonstrarem reações de fluorescência específicas com uma diluição de 1:40 sejam valores normais para explicar as diferenças em sistemas microscópicos, equipas e formações.

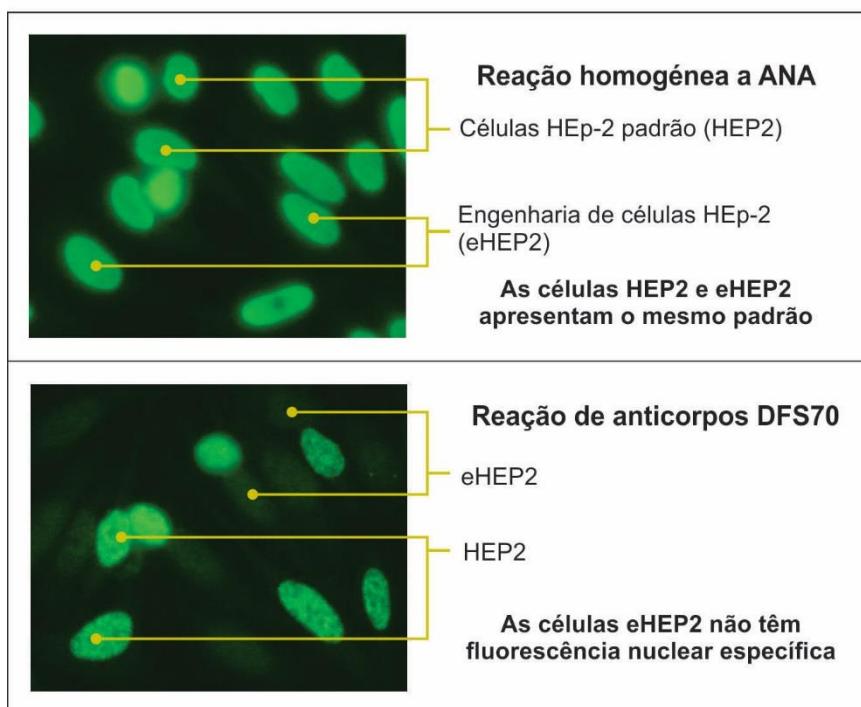
Leia apenas os campos que contêm coloração específica das células HEp-2 e os padrões observados para ANA, AMA e ASMA. Todas as outras reações devem ser relatadas como negativas.

Os anticorpos ANA podem ser quantificados nas células HEp-2. Os padrões de coloração nuclear observáveis incluem homogéneo, periférico (rebordo), pontilhado, nucleolar e centrómero. Estes padrões de coloração nuclear estão descritos abaixo. Pode existir um padrão de coloração ou vários. Os últimos devem-se a reações a diferentes抗ígenos nucleares.

PT

- Homogénea:** Todo o núcleo adquire fluorescência uniformemente com um padrão de coloração difuso.
- Membrana nuclear:** A membrana nuclear mancha o mais intensa como o teste padrão muito bem linear com intensidade de mancha de diminuição da membrana para o centro do núcleo.
- Mosqueada:** Algumas manchas discretas, de grosseiras a finas, adquirem fluorescência por todo o núcleo.
- Nucleolar:** A coloração dos núcélulos como corpos sólidos múltiplos dentro dos núcleos.
- Centrómeros:** Manchas grandes em quantidade limitada. Os anticorpos reactivos separam-se com cromossomos condensados em células submetidas a mitose.
- DFS70:** HEp-2 do tipo selvagem: em ~10% das células de cada poço, será observado um padrão pontilhado fino denso no núcleo interfásico. É observada coloração associada a cromatina em núcleos mitóticos. Os restantes ~90% das células HEp-2 têm gene psip1 a codificar o antígeno LEDGF inativado e, portanto, não produzirão um padrão semelhante.
Se 10% das células HEp-2 tiverem uma fluorescência mais brillante correspondente ao padrão DFS70 e as restantes células apresentarem padrões adicionais ou sinal pontilhado fino acima do valor de corte, isso indica a presença de padrões mistos. É essencial efetuar uma análise mais minuciosa desses padrões para confirmar que outra especificidade de anticorpos está presente além do padrão DFS70 associado ao LEDGF/psip1.

Figura 1. Reações de referência



A especificidade de alguns dos anticorpos que apresentam os padrões de coloração acima pode ser identificada através de testes de anticorpos para nDNA e para vários抗ígenos nucleares extraíveis. Estes podem apresentar uma relevância diagnóstica conforme listado na tabela 1.

Tabela 1. Importância dos anticorpos antinucleares para o diagnóstico

| Padrão de coloração de IF | Natureza do antígeno | Doença associada |
|---------------------------|----------------------|------------------------------------|
| Homogéneo | dsDNA/Histones | LES |
| Membranas nucleares | Lamininas | LES, vasculite ou hepatite crónica |
| Pontilhado | RNP | LES ou DMTC |
| | Sm | LES |
| | SS-A/SS-B | LES ou síndrome de Sjögren |

| | Scl-70 | Esclerodermia |
|------------------------|--|--|
| Nucleolar | RNP-I Pm-Scl RNA/provavelmente U3 RNA | Esclerodermia |
| Centrómero/cinetócoro | placas internas e externas de cinetócoro | Síndrome CREST |
| DFS70 ¹⁵⁻¹⁸ | Padrão pontilhado fino denso (positivo em ~10% das células ou sinal de fluorescência relativamente superior em ~10% das células) | Associação negativa a doenças autoimunes sistémicas, relatada em dermatite atópica, alopecia aerata, doença de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), oftalmia simpática, doença de Behcet e degeneração atípica da retina. |

* Doença mista do tecido conjuntivo

Os anticorpos citoplasmáticos incluem anticorpos antimitocondriais (AMA) e anticorpos antimúsculo liso (ASMA). Num padrão de AMA, o citoplasma surge granular, enquanto o padrão ASMA é uma rede fibrilar de coloração por todo o citoplasma. Ambos os padrões devem ser relatados como negativos para ANA.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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

Nalguns casos a presença de dois ou mais anticorpos num soro os quais sejam reactivos com o mesmo substrato pode provocar uma interferência na sua detecção por imunofluorescência. Esta interferência poderá provocar a falta de detecção de ANA ou a supressão da sua titulação se o anticorpo de interferência tiver uma titulação superior a ANA. Deverão ser registadas todas as reacções ANA.

O Conjugado de IgG de cabra anti-humana com FITC, fornecido com este kit, é principalmente específico de cadeia pesada mas tem uma ligeira actividade de cadeia leve. Esse reage principalmente com auto-anticorpos de classe IgG, mas pode, a um grau inferior, reagir com cadeias leves de outras classes, tais como IgM.

Um ANA positivo não deverá ser considerado, por si só, como diagnóstico de LES. Também se apresentam em doentes com outras doenças do tecido conjuntivo e alguns medicamentos tais como procainamida e hidralazina podem provocar um resultado ANA positivo¹. Para além disso, o soro de doentes com doenças infecciosas e malignas também pode dar ANA positivo²⁰.

Quando redigir um diagnóstico, o médico deve considerar os resultados de todos os testes de imunofluorescência indirecta positivos em conjunto com os resultados de outros testes de laboratório e a condição clínica do doente.

VALORES PREVISTOS

Os testes de anticorpos nucleares são utilizados para detetar LES e determinados outros distúrbios imunológicos. Os anticorpos AMA ocorrem em mais de 90% dos casos de cirrose biliar primária e 3 a 11% dos casos de hepatite crónica. Os anticorpos ASMA ocorrem na maioria dos casos de hepatite ativa crónica.

PT

Tabela 2: incidência de anticorpos antinucleares (ANA) detetados por imunofluorescência indireta em células HEp-2

| Quadro clínico | N.º de soros | % positiva |
|----------------------------|--------------|------------|
| LES | 12 | 100 |
| LE cutâneo subagudo (LECS) | 7 | 86 |
| Esclerodermia | 6 | 100 |
| Artrite reumatóide | 10 | 50 |
| Controlos normais | 15 | 0 |

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O Sistema de Teste de Auto-anticorpos ImmunoGlo™ foi comparado com outro teste de anticorpos fluorescentes obtido no comércio usando células HEp-2 como substrato. A comparação incluiu 15 amostras de soro de indivíduos saudáveis bem como soro de doentes com diagnóstico de LES, Lúpus eritematoso cutâneo subagudo, esclerodermia ou artrite reumatóide. Os soros foram testados de acordo com o método e diluição de controlo recomendados pelo fabricante. Estes resultados comparados obtidos estão abaixo resumidos:

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

| Condição Clínica | N.º de Soro | % Positiva | |
|----------------------------|-------------|------------|-------|
| | | Immco | Outro |
| LES | 12 | 100 | 100 |
| LE Cutânea subagudo (LECS) | 7 | 85 | 85 |
| Esclerodermia | 6 | 100 | 100 |
| Artrite Reumatóide | 10 | 50 | 30 |
| Controlos Normais | 15 | 0 | 0 |

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 33:167-240. 1982.
2. Kumar V et al. Autoimmunity of the skin. In *Concepts in Immunopathology*, Vol 1. Cruse JM, Lewis RE Jr eds. 318-353. 1985.
3. Reimer G et al. The biochemical nature of nuclear antigens reactive with antinuclear antibodies. In *Immunopathology of the Skin*, 3rd Ed. Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V eds. 519-531. 1987.
4. Beutner EH et al. Standardization of antinuclear antibody and other immunofluorescent tests used in immunopathologic studies of the skin. In *Immunopathology of the Skin*, 3rd Ed. Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V eds. 41 -64. 1987.
5. Tan EM et al. 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 et al. 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 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 et al. Primary biliary cirrhosis and mitochondrial autoantigens – insights from molecularbiology. *Hepatology*. 8:147-151. 1988.
10. Berg PA et al. Mitochondrial antigens and autoantibodies from anti-M1 to anti-M9. *Klin Wochenschr*. 64:897-909. 1986.
11. Popper H et al. Clinical, histologic and immunopathologic features of primary biliary cirrhosis. *Springer Semin Immunopathol*. 3:339-354. 1980.
12. Berg PA et al. Serology of primary biliary cirrhosis. *Springer Semin Immunopathol*. 3:355-373. 1980.
13. Anderson P et al. Studies on the specificity of smooth muscle antibodies. *Clin Exp Immunol*. 22:22-29. 1975.
14. Kurki P et al. 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. Ayaki M et al. Antibodies to lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) kill epithelial cells of whole lenses in organ culture. *Exp Eye Res*. 69(1):139-142. 1999.
16. Muro Y. Autoantibodies in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*. 25(3):171-178. 2001.
17. Ochs R et al. The significance of autoantibodies to DFS70/LEDGFp75 in health and disease: integrating basic science with clinical understanding. *Clin Exp Med*. 2015.
18. Bizzaro N et al. Specific chemoluminescence and immunoasorption tests for anti-DFS70 antibodies avoid false positive results by indirect immunofluorescence. *Clin Chim Acta*. 2015.
19. Beutner EH et al. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In *Immunopathology of the Skin*, 3rd Ed. Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V eds.3-40. 1987.
20. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health, 1999 [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395].
21. Nisengard RJ. Antinuclear antibodies: Significance of titers. In *Immunopathology of the Skin*, 2nd Ed. Beutner EH, Chorzelski TP, Kumar V eds. 387-398. 1979.

For technical assistance please contact:



A Trinity Biotech Company

■ IMMCO Diagnostics, Inc.
60 Pineview Drive
Buffalo, NY 14228-2120 USA
Telephone: (716) 691-0091
Fax: (716) 691-0466
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST
E-Mail: info@immco.com
or your local product distributor



[EC]REP

EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands