



ANTINUCLEAR ANTIBODIES HEp-2 (ANA-HEp-2)

Indirect Immunofluorescence HEp-2 CELLS



A.MENARINI
diagnostics

COD 50059 20 x 12 tests

COD 50060 10 x 12 tests

Only for *in vitro* use in the clinical laboratory

INTENDED USE

Reagents for the qualitative determination of antinuclear antibodies in human serum by indirect immunofluorescence. The obtained results are useful as an aid in the diagnosis of several systemic autoimmune diseases.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Serum antinuclear antibodies (ANA) bind to the corresponding antigens present in HEp-2 cells. The resulting antigen-antibody complexes are detected by means of a fluorescein labeled anti-human immunoglobulin, and visualized with the aid of a fluorescence microscope¹.

CONTENTS

		COD 50059	COD 50060
SLIDE	Slides	20 x 12 tests	10 x 12 tests
PBS	PBS (10x)	2 x 100 mL	-
CONTROL +	ANA-Ho Positive Control	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Negative Control	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	2 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Coverslips	1 x 12	-

COMPOSITION

SLIDE HEp-2 cells cultured on each well.

PBS Sodium phosphate 112.5 mmol/L, potassium phosphate 30 mmol/L, sodium chloride 1.15 mol/L, sodium azide 0.95 g/L, pH 7.2.

CONTROL+ Human serum containing antinuclear antibodies (ANA) homogeneous pattern, sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL - Human serum, sodium azide 0.95 g/L.

CONJUGATE Goat anti-human IgG conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), Evans blue 0.01 g/L, sodium azide 0.95 g/L.

MOUNT Mowiol 12%, Glycerol 30%, Tris 20 mmol/L, sodium azide 0.95 g/L.

Human sera used in the preparation of the positive and negative controls have been tested and found to be negative for the presence of antibodies anti-HIV and anti-HCV, as well as for HBs antigen. However, the controls should be handled cautiously as potentially infectious.

STORAGE

Store at 2-8°C.

Reagents are stable until the expiry date shown on the label when stored tightly closed and if contamination is prevented during their use.

Indications of deterioration:

- Liquid components: Presence of particulate material, turbidity.
- Slides: rips in the sealing bag, macroscopic defects on the cell culture like scratches or monolayer peeling off.

AUXILIARY REAGENTS

PBS PBS (10x)

CONJUGATE IgG FITC/Evans

MOUNT Mounting Medium

CONTROL + ANA-Ho Positive Control

CONTROL + ANA-Sp Positive Control: Human serum containing antinuclear antibodies (ANA) speckled pattern, sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL + ANA-Nu Positive Control: Human serum containing antinuclear antibodies (ANA) nucleolar pattern, sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL + ANA-Ce Positive Control: Human serum containing antinuclear antibodies (ANA) centromere pattern, sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL – Negative Control.

REAGENT PREPARATION

PBS: Dilute Reagent B 1/10 with distilled water. Stable 1 month at 2-8°C, if stored at the recommended temperature, well closed and care is taken to prevent contamination during its use.

All other reagents are provided ready to use.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Moist chamber
- Wash tray
- Fluorescence microscope equipped with a 495 nm excitation filter and a 525 nm emission filter for FITC visualization

SAMPLES

Serum or plasma collected by standard procedures. Stable 7 days at 2-8°C.

Dilute samples 1/80 in PBS (see Reagent Preparation) before the assay.

For titration of positive samples, make two-fold serial dilutions starting from 1/160 in PBS.

However, each laboratory should establish its own sample dilution based on the population characteristics.

PROCEDURE

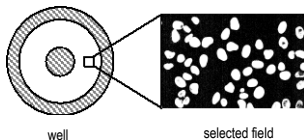
1. Bring the reagents and samples to room temperature.
2. Place 1 drop (25 μ L) of the diluted sample or Control on each slide (A) well, making sure that it is completely covered (Note 1).
3. Incubate the slide for 30 minutes at room temperature (15-30°C) into a moist chamber.
4. Drain sample drops off by gently tapping the inclined slide. Avoid cross-contamination of the sera.
5. Rinse gently the slide with PBS (see Reagent Preparation). (Note 2).
6. Wash thoroughly the slide by immersing in a washing tray filled with PBS for 5 minutes. Change PBS and repeat wash.
7. Carefully dry off the slides by using the blotting paper provided. Keep the substrate moist along the procedure.
8. Place 1 drop of Reagent D on each well. Incubate the slide for 30 minutes at room temperature (15-30°C) into a moist chamber.

9. Wash (step 6) and dry (step 7).

10. Place several drops of Reagent E on the slide and cover with a coverslip avoiding the formation of air bubbles.

READING

Examine the slide using the fluorescence microscope (250-400x). For best results, the slides should be read immediately. Select reading fields in the area indicated in the picture, between the center area and the edge area. Select fields with uniform spacing between cells and uniform nuclei brightness. Fluorescent intensity in the center end edge areas is not representative of the slide preparation.



Observation of specific fluorescent staining, described as follows at the recommended dilution, should be considered as a positive result.

ANA: There are different nuclear and cytoplasmic fluorescent staining patterns that are considered as a positive result for the ANA test. Different staining patterns can coexist in the same serum. Patterns may be modified with the dilution of the serum. The main antinuclear patterns are described below, following the ICAP nomenclature (International Consensus on ANA Patterns)²:

AC-1 Nuclear homogeneous: Homogeneous and regular fluorescence across all nucleoplasm. The nucleoli maybe stained or not stained depending on cell substrate. Mitotic cells (metaphase, anaphase, and telophase) have the chromatin mass intensely stained in a homogeneous hyaline fashion.

AC-3 Centromere: Discrete coarse speckles (40-80/cell) scattered in interphase cells and aligned at the chromatin mass on mitotic cells. e.g. anti-CENP B

AC-4 Nuclear fine speckled Fine tiny speckles across all nucleoplasm. The nucleoli may be stained or not stained. Mitotic cells (metaphase, anaphase, and telophase) have the chromatin mass not stained. e.g. anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La

AC-5 Nuclear large/coarse speckled: Coarse speckles across all nucleoplasm. The nucleoli may be stained or not stained. Mitotic cells (metaphase, anaphase, and telophase) have the chromatin mass not stained. e.g. anti-Sm, anti-U1 RNP

AC-8 Homogeneous nucleolar: Diffuse fluorescence of the entire nucleolus, while the metaphase plate shows no staining. e.g. anti-PM-Scl, anti-Th/To.

AC-9 Clumpy nucleolar: Irregular staining of the nucleoli and Cajal bodies with a peri-chromosomal staining at the metaphase plates. e.g. anti-fibrillarin

AC-21 Cytoplasmic reticular/AMA: Coarse granular filamentous staining extending throughout the cytoplasm. e.g. anti-mitochondrial antibodies

Positive sera may be tittered. The serum titer is defined as the highest dilution showing a positive result.

When none of the above specific stainings are observed, the result should be considered negative for these autoantibodies.

QUALITY CONTROL

Positive Control (CONTROL +) and Negative Control (CONTROL -) provided with kits cod 50059 should be tested together with the patients samples, in order to verify the assay performance.

Positive Control (CONTROL +) should give the above described specific staining.

Negative Control (CONTROL -) should not give any specific staining.

Each laboratory should establish its own internal Quality Control scheme and procedures for corrective action if controls do not recover within the acceptable tolerances.

ASSAY CHARACTERISTICS

The IgG FITC/Evans conjugate is calibrated versus the International Standard of the WHO for sheep anti-human immunoglobulins conjugated with FITC.

The specificity of the ANA-Ho Positive Control has been verified against the AF/CDC1 reference serum from the Centers for Disease Control.

DIAGNOSTIC CHARACTERISTICS

ANA: Sensitivity of antinuclear antibodies determination is higher than 95% for systemic lupus erythematosus, although specificity is fairly low³.

- **Nuclear homogeneous (AC-1):** Indicative of systemic lupus erythematosus.
- **Nuclear speckled (AC4, AC-5):** Highly related to systemic lupus erythematosus, mixed connective tissue disease, Sjögren's syndrome, polymyositis or scleroderma.
- **Nucleolar (AC-8, AC-9):** In approximately 50-70% of the patients with overlapping scleroderma and polymyositis/dermatomyositis syndromes. They are found in up to 33% of patients with systemic scleroderma, specially those with renal complications³.
- **Centromere (AC-3):** In patients with systemic sclerosis, especially in a cutaneous limited form of the disease (80%). Occasionally, in some other connective diseases⁴.
- **Mitochondrial (AC-21):** Common in patients with primary biliary cirrhosis, systemic sclerosis, and rare in other systemic autoimmune rheumatic diseases.

Menarini antinuclear antibodies kit was used to test 140 sera from a variety of autoimmune disease patients (systemic lupus erythematosus, Sjögren syndrome, scleroderma, CREST syndrome, dermatopolymyositis, rheumatoid arthritis, autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis), as well as healthy donors. The results showed a diagnostic sensitivity and specificity for all the autoimmune diseases of 98,3% and 93%, respectively.

Clinical diagnosis should not be made on the findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

NOTES

1. Avoid touching the cells fixed into the wells along the procedure.
2. Use a squeeze bottle or a pipette to wash the slides, avoiding cross-contamination among the adjacent samples.

BIBLIOGRAPHY

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, Cruvinel WM, Carvalho Francescantonio PL, Fritzler MJ, Garcia-De La Torre I, Herold M, Mimori T, Satoh M, von Mühlen CA and Andrade LEC. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. *Frontiers in Immunology* 2015; 6: 1-13
3. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. Fritzler MJ, Rattner JB. Autoantibodies to the mitotic apparatus: biological breakthroughs, clinical application, etiological complexity. In: Konrad K, Humbel RL, Meurer M, Shonfeld Y and Tan EM, eds. Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity. Pabst Science Publishers, 2000.

**ANTICORPI ANTI-NUCLEO HEp-2 (ANA- HEp-2)**

Immunofluorescenza Indiretta CELLULE HEp-2

**A.MENARINI**
diagnostics

COD 50059 20 x 12 det.

COD 50060 10 x 12 det.

Solo per uso in vitro nel laboratorio clinico

USO PREVISTO

Reattivi per la determinazione qualitativa degli anticorpi antinucleo utilizzati nei metodi di immunofluorescenza indiretta per la rilevazione di anticorpi nel siero umano. I risultati ottenuti sono utili come aiuto nella diagnosi di diverse malattie autoimmuni sistemiche.

PRINCIPIO DEL METODO

Gli anticorpi antinucleo (ANA) del siero si legano ai corrispondenti antigeni presenti nelle cellule HEp-2. Una volta uniti, gli anticorpi vengono evidenziati mediante l'incubazione con un anticorpo contro le immunoglobuline umane coniugato con fluoresceina e visualizzati mediante microscopia a fluorescenza¹.

CONTENUTO

		COD 50059	COD 50060
SLIDE	Vetrini	20 x 12 det.	10 x 12 det.
PBS	PBS (10x)	2 x 100 mL	-
CONTROL +	Cont. Posit. ANA- Ho	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Controllo Negativo	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	2 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Vetrini coprioggetto	1 x 12	-

COMPOSIZIONE

SLIDE Cellule HEp2 coltivate in ogni pozzetto.

PBS Fosfato di sodio 112,5 mmol/L, fosfato di potassio 30 mmol/L, cloruro sodico 1,15 mol/L, azide di sodio 0,95 g/L, pH 7,2.

CONTROL + Siero umano con anticorpi antinucleo (ANA) standard omogeneo, azide di sodio 0,95 g/L.

CONTROL - Siero umano, azide di sodio 0,95 g/L.

CONJUGATE Anticorpi di capra anti-immunoglobuline IgG umane coniugati con isotiocianato di fluoresceina (FITC), blu di Evans 0,01 g/L, azide di sodio 0,95 g/L

MOUNT Mezzo di Montaggio: Mowiol 12%, Glicerolo 30%, Tris 20 mmol/L, azide di sodio 0,95 g/L.

I sieri umani utilizzati nella preparazione del Controllo Positivo e Negativo, è negativo per l' antigene HBs e per gli anticorpi anti-HCV e anti-HIV. Tuttavia, i Controlli vanno trattati con precauzione come potenzialmente infettivi.

CONSERVAZIONE

Conservare a 2-8°C.

I reattivi sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull' etichetta, purchè conservati ben chiusi ed evitandone la contaminazione durante l'uso.

Indicazioni di deterioramento:

- Componenti liquidi: Presenza di particelle, torbidità.
- Portaoggetti: Rottura della busta contenente i vetrino, difetti macroscopici come distacco o alterzioni delle cellule.

REATTIVI AUSILIARI

PBS PBS (10x).

CONJUGATE IgG FITC/Evans, coniugato con colorante di contrasto blu di Evans.

MOUNT Mezzo di Montaggio.

CONTROL + Controllo Positivo ANA-Ho.

CONTROL + Controllo Positivo ANA-Sp: Siero umano con anticorpi antinucleo (ANA) pattern punteggiato, azide di sodio 0,95 g/L.

CONTROL + Controllo Positivo ANA-Nu: Siero umano con anticorpi antinucleo (ANA) pattern nucleolare, azide di sodio 0,95 g/L.

CONTROL + Controllo Positivo ANA-Ce: Siero umano con anticorpi antinucleo (ANA) pattern centromero, azide di sodio 0,95 g/L.

CONTROL- Controllo Negativo.

PREPARAZIONE DEI REATTIVI

PBS: Effettuare una diluizione 1/10 del reagente B con acqua distillata. Stabile 1 mese a 2-8°C, se mantenuto alla temperatura raccomandata, ben chiuso e se si presta attenzione a evitare la contaminazione durante l'uso.

Gli altri componenti sono pronti all'uso.

MATERIALI AGGIUNTIVI

- Camera umida
- Vaschetta di lavaggio
- Microscopio in fluorescenza equipaggiato con filtri di eccitazione da 495 nm e di emissione da 525 nm per la visualizzazione del FITC.

CAMPIONI

Siero o plasma raccolti mediante procedimenti standard. Stabile una settimana a 2-8°C.

Diluire i campioni 1/80 in PBS (vedere Preparazione dei Reattivi) prima del test.

Per la titolazione di un campione positivo, realizzare diluizioni doppie in PBS a partire da 1/160.

Tuttavia, ogni laboratorio dovrà predisporre un proprio esempio di diluizione sulla base delle caratteristiche della popolazione.

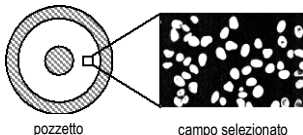
PROCEDIMENTO

1. Portare i reattivi ed i campioni a temperatura ambiente.
2. Depositare una goccia (25 μ L) di campione diluito o dei Controlli nei pozzetti del vetrino (A), procurando di coprirlo perfettamente (Nota 1).
3. Incubare il vetrino in camera umida per 30 minuti a temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminare le gocce dei campioni inclinando il vetrino e picchiettandolo leggermente. Evitare di mescolare i sieri.
5. Eliminare il siero rimanente nel vetrino lavandolo con PBS (vedere preparazione del Reattivo). (Nota 2).
6. Lavare il vetrino immergendolo in una vaschetta con PBS per 5 minuti. Cambiare il PBS e ripetere il lavaggio.
7. Asciugare con cura il vetrino utilizzando la carta bibula fornita. Il substrato deve restare sempre umido.

8. Depositare una goccia di Reattivo D in ogni pozzetto. Collocare il vetrino in una camera umida e incubare a temperatura ambiente (15-30°C) per 30 minuti.
9. Lavare (vedere punto 6) ed asciugare (vedere punto 7).
10. Depositare alcune gocce di Reattivo E sopra il vetrino e porre un coprioggetti evitando la formazione di bolle d'aria.

LETTURA

Esaminare le cellule con un microscopio a fluorescenza (250-400x). Si raccomanda di eseguire la lettura immediatamente. Per eseguire la lettura, selezionare campi di osservazione della zona indicata nello schema, tra il centro e la periferia del pozzetto. Selezionare campi con distribuzione di cellule ed intensità di fluorescenza uniformi. L'intensità di fluorescenza alla periferia o al centro del pozzetto non è da tenere in considerazione.



L'osservazione del marcaggio fluorescente specifico descritto di seguito indica un risultato positivo alla diluizione raccomandata.

ANA: Vari pattern di colorazione a fluorescenza nucleare e citoplasmatico sono ritenuti un risultato positivo nell'ambito di questo test. In un medesimo siero possono coesistere pattern diversi, eventualmente modificabili tramite la diluizione del siero medesimo. Di seguito, si descrivono i principali pattern anti-nucleo, secondo la nomenclatura ICAP (International Consensus on ANA Patterns)²:

AC-1 Nucleare Omogeneo: Fluorescenza omogenea e regolare nel nucleoplasma. I nucleoli potrebbero dare segnale fluorescente o meno, a seconda del substrato cellulare. Le cellule mitotiche (metafase, anafase e telofase) hanno un'intensa fluorescenza a livello della cromatina, con colorazione ialina omogenea.

AC-3 Centromero: Punti grossi in numero discreto (40-80/cellula) diffusi nella cellula in interfase, e allineati a livello della cromatina sulle cellule mitotiche, es. anti-CENP B

AC-4 Nucleare punteggiato fine: Punti fini e piccoli diffusi nel nucleoplasma. I nucleoli potrebbero essere fluorescenti o meno. Le cellule mitotiche (metafase, anafase e telofase) hanno una massa cromatinica non fluorescente, es. anti-Ro/SSA, anti-La/SSB.

AC-5 Punteggiato nucleare a grossi granuli: Grossi granuli diffusi nel nucleoplasma. I nucleoli potrebbero essere fluorescenti o meno. Le cellule mitotiche (metafase, anafase e telofase) non mostrano fluorescenza a livello della massa cromatinica, es. anti-Sm, anti-U1 RNP

AC-8 Nucleolare omogeneo: Fluorescenza diffusa dell'intero nucleolo, assenza di colorazione della piastra metafase nelle cellule in mitosi (es. anti-PM/ScI, anti Th/To)

AC-9 Nucleolare granulare (granulosità grossolana): Colorazione irregolare dei nucleoli e dei "corpi di Cajal" con colorazione periferica della piastra metafase (es. anti-fibrillarina)

AC-21 Citoplasmatico reticolare/AMA: Fluorescenza punteggiata grossolana-filamentosa che si estende attraverso tutto il citoplasma (es: anticorpi anti-mitocondrio)

I campioni positivi possono essere titolati. Si definisce il titolo come la diluizione più alta che dà risultato positivo.

Qualora non si osservi nessuno dei marcaggi specifici descritti, il risultato è negativo per gli autoanticorpi indicati.

CONTROLLO DI QUALITA'

Il Controllo Positivo (CONTROL+) e il Controllo Negativo (CONTROL-) forniti con i kits cod 50059 debbono essere testati insieme ai campioni dei pazienti per verificare la funzionalità del procedimento.

Il Controllo Positivo (CONTROL+) deve presentare il pattern tipico, descritto sopra.

Il Controllo Negativo (CONTROL-) non deve dare luogo a nessun tipo di fluorescenza specifica.

Ogni laboratorio deve stabilire il proprio programma di Controllo di Qualità interno, così pure procedimenti di correzione nel caso che i controlli non rientrino nelle tolleranze accettabili.

CARATTERISTICHE DEL TEST

Il coniugato IgG FITC/Evans è stato calibrato secondo lo standard internazionale dell'OMS di anti-immunoglobuline umane di pecora coniugate con FITC.

La specificità del Controllo Positivo ANA-Ho è verificata contro il siero di riferimento AF/CDC1 dei *Centers for Disease Control*.

CARATTERISTICHE DIAGNOSTICHE

ANA: La determinazione degli anticorpi anti-nucleo ha una sensibilità superiore al 95% per il lupus eritematoso sistemico, e una bassa specificità³.

- **Nucleare Omogeneo (AC-1):** Indicativo di lupus eritematoso sistemico.
- **Nucleare Punteggiato (AC-4, AC-5):** Associato al lupus eritematoso sistemico, patologia mista del tessuto connettivo, sindrome di Sjögren, polimiosite o scleroderma.
- **Nucleolare (AC-8, AC-9):** In circa un 50-70% di pazienti con scleroderma e polimiosite/dermatomiosite. Si presenta in un 33% di pazienti con scleroderma sistemico, specialmente con complicazioni renali³.
- **Centromero (AC-3):** In pazienti con sclerosi sistemica, specialmente nella forma con implicazione cutanea (80%). Occasionalmente, in altre patologie del connettivo⁴.
- **Citoplasmatico reticolare/AMA (AC-21):** Comune in cirrosi biliare primitiva, sclerosi sistemica, raro in altre SARD.

Ci si è avvalsi del kit Menarini di anticorpi antinucleari per determinare 140 sieri di un ampio spettro di pazienti affetti da malattie autoimmuni (lupus eritematoso sistemico, sindrome di Sjögren, scleroderma, sindrome di CREST, dermatopolimiosite, artrite reumatoide, epatite autoimmune e cirrosi biliare primaria) nonché donanti sani. Gli esiti hanno evidenziato una sensibilità e una specificità diagnostica per tutte le malattie autoimmuni pari rispettivamente al 98,3% e al 93%.

Ai fini della diagnosi clinica non sarà sufficiente l'esito di tale test ma occorrerà tener conto anche dei dati clinici e di laboratorio.

NOTE

1. Evitare di toccare le cellule del pozzetto durante tutta la prova.
2. Utilizzare una spruzzetta o pipetta per questo lavaggio, evitando la possibile contaminazione con i campioni adiacenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. *Methods in Nonradioactive Detection*. Appleton & Lange, 1993.
2. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, Cruvinel WM, Carvalho Francescantonio PL, Fritzler MJ, Garcia-De La Torre I, Herold M, Mimori T, Satoh M, von Mühlen CA and Andrade LEC. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. *Frontiers in Immunology* 2015; 6: 1-13
3. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. En: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. *Autoantibodies*. Elsevier, 1996.
4. Fritzler MJ, Rattner JB. Autoantibodies to the mitotic apparatus: biological breakthroughs, clinical application, etiological complexity. En: Konrad K, Humbel RL, Meurer M, Shonfeld Y and Tan EM, eds. *Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity*. Pabst Science Publishers, 2000.



ANTI-NUCLEAR ANTIBODIES HEp-2 (ANA-HEp-2)

Inmunofluorescencia Indirecta - CÉLULAS HEp-2



A.MENARINI
diagnostics

COD 50059 20 x 12 det.

COD 50060 10 x 12 det.

Sólo para uso in vitro en el laboratorio clínico

USO PREVISTO

Reactivos para la determinación cualitativa de anticuerpos antinucleares en suero humano mediante inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos son útiles como ayuda en el diagnóstico de varias enfermedades autoinmunes sistémicas.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los anticuerpos antinucleares (ANA) del suero se unen a sus correspondientes antígenos presentes en las células HEp-2. Una vez unidos, los anticuerpos se ponen de manifiesto mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas humanas conjugado con fluoresceína y se visualizan por microscopía de fluorescencia¹.

CONTENIDO

		COD 50059	COD 50060
SLIDE	Portaobjetos	20 x 12 det.	10 x 12 det.
PBS	PBS (10x)	2 x 100 mL	-
CONTROL +	Cont. Posit. ANA- Ho	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Control Negativo	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	2 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Cubreobjeto	1 x 12	-

COMPOSICIÓN

SLIDE Células HEp2 cultivadas en cada pocillo.

PBS Fosfato de sodio 112,5 mmol/L, fosfato de potasio 30 mmol/L, cloruro sódico 1,15 mol/L, azida de sodio 0,95 g/L, pH 7,2.

CONTROL+ Suero humano con anticuerpos antinucleares (ANA) patrón homogéneo, azida de sodio 0,95 g/L.

CONTROL- Suero humano, azida de sodio 0,95 g/L.

CONJUGATE Anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas IgG humanas conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), azul de Evans 0,01 g/L, azida de sodio 0,95 g/L

MOUNT Medio de Montaje: Mowiol 12%, Glicerol 30%, Tris 20 mmol/L, azida de sodio 0,95 g/L.

Los sueros humanos utilizados en la preparación del control negativo y el control positivo eran negativos para el antígeno HBs y para los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV. Sin embargo, los controles deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Componentes líquidos: Presencia de partículas, turbidez.
- Portaobjetos: Roturas en el sobre contenedor, defectos macroscópicos como ralladuras o despegues en el cultivo de células.

REACTIVOS AUXILIARES

PBS PBS (10x).

CONJUGATE IgG FITC/Evans.

MOUNT Medio de Montaje.

CONTROL+ Control Positivo ANA-Ho.

CONTROL+ Control Positivo ANA-Sp: Suero humano con anticuerpos antinucleares (ANA) patrón moteado, azida de sodio 0,95 g/L.

CONTROL+ Control Positivo ANA-Nu: Suero humano con anticuerpos antinucleares (ANA) patrón nucleolar, azida de sodio 0,95 g/L.

CONTROL+ Control Positivo ANA-Ce: Suero humano con anticuerpos antinucleares (ANA) patrón centrómero, azida de sodio 0,95 g/L.

CONTROL- Control Negativo.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

PBS: Efectuar una dilución 1/10 del Reactivo B con agua destilada. Estable 1 mes a 2-8°C, si se conserva a la temperatura recomendada, bien cerrado y se tiene cuidado para evitar contaminaciones durante su uso.

Los demás componentes están listos para su uso.

EQUIPO ADICIONAL

- Cámara húmeda
- Cubeta de lavado
- Microscopio de fluorescencia equipado con filtros de excitación de 495 nm y de emisión de 525 nm para la visualización del FITC.

MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar. Estable una semana a 2-8°C.

Diluir las muestras 1/80 en PBS (ver Preparación de los Reactivos) antes del ensayo.

Para la titulación de una muestra positiva, realizar diluciones dobles en PBS a partir de la 1/160.

Sin embargo, cada laboratorio debería establecer su propio ejemplo de dilución basado en las características de la población.

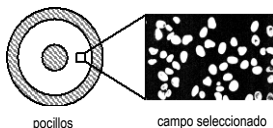
PROCEDIMIENTO

1. Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente.
2. Depositar una gota (25 μ L) de la muestra diluida o de los Controles en los pocillos del portaobjetos (A), procurando cubrirlo perfectamente (Nota 1).
3. Incubar el portaobjetos en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminar las gotas de las muestras inclinando el portaobjetos y golpeándolo ligeramente. Evitar la mezcla de sueros.
5. Eliminar el suero remanente en el portaobjetos lavándolo con PBS (ver preparación del Reactivo). (Nota 2).
6. Lavar el portaobjetos sumergiéndolo en una cubeta con PBS durante 5 minutos. Cambiar el PBS y repetir el lavado.
7. Secar cuidadosamente el portaobjetos utilizando el papel secante suministrado. El sustrato debe permanecer siempre húmedo.

8. Depositar una gota de Reactivo D en cada pocillo. Colocar el portaobjetos en una cámara húmeda e incubar a temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos.
9. Lavar (ver paso 6) y secar (ver paso 7).
10. Depositar varias gotas de Reactivo E sobre el portaobjetos y colocar un cubreobjetos procurando evitar la formación de burbujas de aire.

LECTURA

Examinar las células con un microscopio de fluorescencia (250-400x). Es recomendable realizar la lectura de inmediato. Para realizar la lectura, seleccionar campos de observación de la zona indicada en el esquema, entre el centro y la periferia del pocillo. Seleccionar campos con distribución de células e intensidad de fluorescencia uniformes. La intensidad de marcaje de la periferia o del centro del pocillo no es representativa de la preparación.



La observación de marcaje fluorescente específico descrito a continuación indica un resultado positivo a la dilución recomendada.

ANA: Existen diferentes patrones de fluorescencia nucleares y citoplásmicos que son considerados como un resultado positivo para la prueba. Distintos patrones pueden coexistir en un mismo suero e incluso modificarse con la dilución del mismo. Los principales patrones anti-nucleares se describen a continuación, siguiendo la nomenclatura del ICAP (International Consensus on ANA Patterns)²:

AC-1 Nuclear homogéneo: Fluorescencia homogénea y regular a través de todo el nucleoplasma, los nucléolos pueden o no fluorecer dependiendo del sustrato celular. Las células en mitosis (metáfase, anáfase y telófase) tienen la cromatina intensamente fluorescente de manera homogénea.

AC-3 Centrómico: Granular grueso discreto (40 – 80/célula) dispersos en los núcleos de las células en interfase y alineados en la masa de la cromatina en las células mitóticas. Por ejemplo anti-CENP-B

AC-4 Nuclear granular fino: Gránulos diminutos finos a través de todo el nucleoplasma. El nucléolo puede teñirse o no. Las células mitóticas (metáfase, anáfase y telófase) tienen la masa de la cromatina no teñida. Por ejemplo anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La

AC-5 Nuclear granular grueso/grande: Gránulos gruesos a través de todo el nucleoplasma. El nucléolo puede teñirse o no. Las células mitóticas (metáfase, anáfase y telófase) tienen la masa de la cromatina no teñida. por ejemplo anti-Sm, anti-U1 RNP

AC-8 Nucleolar homogéneo: Fluorescencia difusa en todo el nucléolo, mientras que la placa metafásica no muestra tinción. Ej. Anti-PM-Scl, anti Th/To.

AC-9 Nucleolar grueso: Tinción irregular del nucléolo y cuerpos de Cajal, con tinción peri-cromosomal en las placas metafásicas. Ej. anti-fibrilarina.

AC-21 Citoplásmico reticular /AAM: Tinción de filamentos granulares gruesos que se extienden a través del citoplasma. Ej. anticuerpos anti- mitocondriale

Las muestras positivas pueden titularse. Se define el título como la dilución mayor que da resultado positivo. Cuando no se observa ninguno de los marcajes específicos descritos, el resultado es negativo para los autoanticuerpos indicados.

CONTROL DE CALIDAD

El Control Positivo (CONTROL+) y el Control Negativo (CONTROL-) suministrados con los kits cod 50059 deben ser ensayados junto con las muestras de los pacientes para verificar la funcionalidad del procedimiento de ensayo.

El Control Positivo (CONTROL+) debe proporcionar el marcaje específico descrito en el apartado anterior.

El Control Negativo (CONTROL-) no debe proporcionar marcaje específico alguno.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

El conjugado IgG FITC/Evans está calibrado frente al Patrón Internacional de la OMS de anti-inmunoglobulinas humanas de oveja conjugadas con FITC.

La especificidad del Control Positivo ANA-Ho está verificada frente al suero de referencia AF/CDC1 de los Centers for Disease Control.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

ANA: La determinación de anticuerpos anti-nucleares tiene una sensibilidad superior al 95% para el lupus eritematoso sistémico, y una baja especificidad³.

- **Nuclear homogéneo (AC-1):** Indicativo de lupus eritematoso sistémico.
- **Nuclear granular (AC-4, AC-5):** Asociado al lupus eritematoso sistémico, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de Sjögren, polimiositis o escleroderma.
- **Nucleolar (AC-8, AC-9):** En aproximadamente un 50-70% de pacientes con solapamiento de escleroderma y polimiositis/dermatomiositis. Se presenta en hasta un 33% de pacientes con escleroderma sistémica, especialmente con complicaciones renales³.
- **Centrómero (AC-3):** En pacientes con esclerosis sistémica, especialmente en la forma de la enfermedad con implicación cutánea (80%). Ocasionalmente, en otras enfermedades conectivas⁴.
- **Mitochondrial (AC-21):** Común en cirrosis biliar primaria, esclerosis generalizada y raro en otras enfermedades autoinmunes sistémicas.

El kit Menarini anticuerpos anti-nucleares fue usado para determinar 140 sueros de una variedad de pacientes con enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, escleroderma, síndrome de CREST, dermatopolimiositis, artritis reumatoide, hepatitis autoinmune y cirrosis biliar primaria), así como donantes sanos. Los resultados mostraron una sensibilidad y especificidad diagnóstica para el conjunto de enfermedades autoinmunes del 98,3% y 93%, respectivamente.

El diagnóstico clínico no debe basarse exclusivamente en el resultado de este ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

1. Evitar tocar las células del pocillo durante todo el procedimiento.
2. Utilizar un frasco lavador o pipeta para este lavado, evitando la posible contaminación con las muestras adyacentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, Cruvinel WM, Carvalho Franciscantonio PL, Fritzier MJ, Garcia-De La Torre I, Herold M, Mimori T, Satoh M, von Mühlen CA and Andrade LEC. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. *Frontiers in Immunology* 2015; 6: 1-13
3. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. Fritzier MJ, Rattner JB. Autoantibodies to the mitotic apparatus: biological breakthroughs, clinical application, etiological complexity. In: Konrad K, Humbel RL, Meurer M, Shonfeld Y and Tan EM, eds. Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity. Pabst Science Publishers, 2000.



ANTICORPS ANTI-NUCLEAIRE HEp-2 (ANA-HEp-2)

Immunofluorescence Indirecte HEp-2 CELLS



A.MENARINI
diagnostics

COD 50059 20 x 12 tests

COD 50060 10 x 12 tests

A utiliser uniquement in vitro dans les laboratoires cliniques

USAGE PRÉVU

Réactifs pour la détermination qualitative d'anticorps antinucléaire dans le sérum humain par immunofluorescence indirecte. Les résultats obtenus sont utiles pour aider au diagnostic de plusieurs maladies auto-immunes systémiques.

PRINCIPE DE LA METHODE

Les anticorps antinucléaire du sérum (ANA) se lient aux antigènes correspondants présents dans les cellules HEp-2. Les complexes antigènes-anticorps résultants sont détectés au moyen d'un anticorps anti-immunoglobuline humaine marqué à la fluorescéine, et visualisés à l'aide d'un microscope à fluorescence¹.

CONTENU

		COD 50059	COD 50060
SLIDE	Lames	20 x 12 tests	10 x 12 tests
PBS	PBS (10x)	2 x 100 mL	-
CONTROL +	Contrôle Positif ANA-Ho	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Contrôle Négatif	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	2 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Couvre-lames	1 x 12	-

COMPOSITION

SLIDE Cellules en culture HEp-2 dans chaque puits.

PBS Phosphate de sodium 112,5 mmol/L, phosphate de potassium 30 mmol/L, chlorure de sodium 1,15 mol/L, azide de sodium 0,95 g/L, pH 7,2.

CONTROL + Sérum humain contenant des anticorps antinucléaire (ANA) de profil homogène, azide de sodium 0,95 g/L.

CONTROL- Sérum humain, azide de sodium 0,95 g/L.

CONJUGATE Anticorps de chèvre anti-IgG humaine conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), bleu Evans 0,01 g/L, azide de sodium 0,95 g/L.

MOUNT Milieu de Montage: Mowiol 12%, Glycérol 30%, Tris 20 mmol/L, azide de sodium 0,95 g/L.

Les sérums humains utilisés pour la préparation des contrôles positif et négatif sont négatifs pour l'antigène HBs et pour les anticorps anti-HCV et anti-HIV. Cependant, les contrôles doivent être traités avec précaution comme potentiellement infectieux.

CONSERVATION

Conserver à 2-8°C.

Les réactifs sont stables jusqu'à la date limite indiquée sur l'étiquette à condition d'être toujours conservés bien fermés et d'éviter toute contamination pendant leur utilisation.

Indications de dégradation:

- Composants liquides: Présence de particules, turbidité.
- lames: ruptures de l'emballage, défauts macroscopiques des cultures cellulaires comme des éraflures ou des décollements de la monocouche.

REACTIFS SUPPLEMENTAIRES

PBS PBS (10x).

CONJUGATE IgG FITC/Evans.

MOUNT Milieu de Montage.

CONTROL+ Contrôle Positif ANA-Ho.

CONTROL+ Contrôle Positif ANA-Sp: Sérum humain contenant des anticorps antinucléaire (ANA) de profil moucheté, azide de sodium 0,95 g/L.

CONTROL+ Contrôle Positif ANA-Nu: Sérum humain contenant des anticorps antinucléaire (ANA) de profil nucléolaire, azide de sodium 0,95 g/L.

CONTROL+ Contrôle Positif ANA-Ce: Sérum humain contenant des anticorps antinucléaire (ANA) de profil centromère, azide de sodium 0,95 g/L.

CONTROL- Contrôle négatif.

PREPARATION DU REACTIF

PBS: Effectuer une dilution 1/10 du Réactif B avec de l'eau distillée. Stable 1 mois à 2-8°C, s'il est conservé à la température recommandée, bien fermé et si des précautions sont prises pour éviter les contaminations pendant son utilisation.

Les autres réactifs sont prêts à l'emploi.

EQUIPEMENT SUPPLEMENTAIRE

- Chambre humide
- Boîte de lavage
- Microscope à fluorescence équipé d'un filtre à excitation 495 nm et d'un filtre à émission à 525 nm pour la visualisation FITC.

ECHANTILLONS

Le sérum ou le plasma est collecté par des procédures standards. Stables 1 semaine à 2-8°C.

Diluer l'échantillon au 1/80 dans du PBS (voir Préparation des Réactifs) avant le test.

Pour titrer les échantillons positifs, faire des doubles dilutions en série à partir de celle au 1/160 dans du PBS.

Toutefois, chaque laboratoire devrait établir son propre exemple de dilution basé sur les caractéristiques de la population.

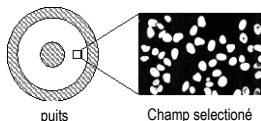
PROCEDURE

1. Placer les réactifs et les échantillons à température ambiante.
2. Déposer une goutte (25 µL) de l'échantillon dilué ou du Contrôle dans chaque puits de la lame (A), faire attention qu'il soit complètement recouvert (Note 1).
3. Incuber la lame 30 minutes à température ambiante (15-30°C) dans une chambre humide.
4. Eliminer les gouttes d'échantillons en tapotant doucement la lame inclinée. Eviter des contaminations entre les sérums.
5. Rincer doucement la lame avec le PBS (voir Préparation des Réactifs) (Note 2).
6. Bien laver la lame en l'immergeant dans la boîte de lavage remplie de PBS pendant 5 minutes. Changer le PBS et répéter le lavage.
7. Sécher avec précaution les lames en utilisant le papier absorbant fourni. Garder la coupe de tissu humide pendant la procédure.
8. Déposer 1 goutte de Réactif D dans chaque puits. Incuber la lame 30 minutes à température ambiante (15-30°C) dans une chambre humide.

9. Laver (étape 6) et sécher (étape 7).
10. Déposer plusieurs gouttes de Réactif E sur la lame et la recouvrir avec un couvre-lame en évitant la formation de bulles d'air.

LECTURE

Examiner la lame en utilisant un microscope à fluorescence (250-400x). Pour de meilleurs résultats, les lames doivent être lues immédiatement. Sélectionner les champs de lecture dans l'aire indiquée sur la figure, entre le centre de l'aire et le bord de l'aire. Sélectionner les champs avec un espace uniforme entre les cellules et une brillance des noyaux uniforme. L'intensité de la fluorescence au centre et au bord des régions n'est pas représentative de la préparation de la lame.



L'observation d'un marquage fluorescent, décrit ci-dessous à la dilution recommandée, doit être considérée comme un résultat positif

ANA: Il existe différents patrons de fluorescence nucléaires et cytoplasmiques qui sont considérés comme un résultat positif pour le test. Différents patrons peuvent coexister dans un même sérum et même se modifier avec sa dilution. Les principaux patrons anti-nucléaires sont décrit ci-après, en suivant la nomenclature de l'ICAP (International Consensus on ANA Patterns)²:

- **AC-1 Nucléaire homogène:** Fluorescence homogène et régulière dans tout le nucléoplasme. Les nucléoles peuvent ou non être fluorescents selon le substrat cellulaire. Les cellules en mitose (métaphase, anaphase et télophase) ont la chromatine intensément fluorescente de manière homogène.
- **AC-3 Centromère:** Granulaire gros discontinu (40 – 80/cellule) dispersé dans les noyaux des cellules en interphase et alignés dans la masse de la chromatine dans les cellules mitotiques. Par exemple anti-CENP-B
- **AC-4 Nucléaire granulaire fin:** Minuscules granules fines dans tout le nucléoplasme. Le nucléole peut se colorer ou non. Les cellules mitotiques (métaphase, anaphase et télophase) ont la masse de la chromatine non colorée. Par exemple, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La
- **AC-5 Nucléaire granulaire gros/grand:** Gros granules dans tout le nucléoplasme. Le nucléole peut se colorer ou non. Les cellules mitotiques (métaphase, anaphase et télophase) ont la masse de la chromatine non colorée. Par exemple anti-Sm, anti-U1 RNP
- **AC-8 Nucléolaire homogène :** Fluorescence diffuse dans tout le nucléole, tandis que la plaque métaphasique n'est pas colorée. Ex. Anti-PM-Scl, anti Th/To.
- **AC-9 Nucléolaire grumeleux:** Coloration irrégulière du nucléole et corps de Cajal, avec coloration péri-chromosomique sur les plaques métaphasiques. Ex. anti-fibrillarine.
- **AC-21 Cytoplasmique réticulaire /AAM:** Coloration de gros filaments granulaires qui s'étendent dans tout le cytoplasme. Ex. anticorps anti-mitochondrie

Les sérums positifs peuvent être titrés. Le titre du sérum est défini comme la dilution la plus élevée donnant un résultat positif.

Quand aucun des marquages spécifiques ci-dessus n'est observé, le résultat doit être considéré comme négatif pour ces anticorps.

CONTROLE DE QUALITE

Le Contrôle Positif (CONTROL+) et le Contrôle Négatif (CONTROL-) fournis avec les kits cod 50059 doivent être testés ensemble sur des échantillons de patients afin de vérifier la performance du test.

Le Contrôle Positif (CONTROL+) doit donner les marquages spécifiques décrits ci-dessus.

Le Contrôle Négatif (CONTROL-) ne doit donner aucun marquage spécifique.

Chaque laboratoire doit établir ses propres protocoles et méthodes de Contrôle de Qualité interne afin d'apporter les modifications nécessaires en cas de dépassement des tolérances.

CARACTERISTIQUES DU TEST

Le conjugué IgG FITC/Evans est calibré par rapport à l'Étalon International de l'OMS d'anti-immunoglobulines humaines de brebis conjuguées avec FITC.

La spécificité du Contrôle positif ANA-Ho a été vérifiée par rapport au sérum de référence AF/CDC1 for Disease Control).

CARACTERISTIQUES DIAGNOSTIQUES

ANA: La sensibilité des anticorps anti-nucléaire est plus élevée de 95% pour le lupus érythémateux systémique, bien que la spécificité soit plus faible³.

- **Nucléaire homogène (AC-1):** Indicatif de lupus érythémateux systémiques.
- **Nucléaire granulaire (AC-4, AC-5):** Associé au lupus érythémateux systémique, maladie mixte du tissu connectif, syndrome de Sjögren, polymyosite ou sclérodermie.
- **Nucléolaire (AC-8, AC-9):** Chez environ 50-70% des patients atteints de syndromes chevauchants de sclérodermie et de polymyosite/ dermatomyosite. Ils sont trouvés chez plus de 33% des malades atteints de sclérodermies systémique, particulièrement celles avec des complications rénales³.
- **Centromère (AC-3):** Chez les patients atteints de sclérose systémique, particulièrement dans les formes cutanées de la maladie (80%). Occasionnellement, dans d'autres maladies conjonctives⁴.
- **Mitochondrial (AC-21):** Commun dans la cirrhose biliaire primaire, sclérose généralisée et rare dans d'autres maladies auto-immunes systémiques.

Le kit Menarini d'anticorps anti-nucléaires a été utilisé pour déterminer 140 sérums à partir d'une variété de patients ayant des maladies auto-immunes (lupus érythémateux systémique, syndrome de Sjögren, sclérodermie, syndrome de CREST, dermatopolymyosite, arthrite rhumatoïde, hépatite auto-immune et cirrhose biliaire primaire) ainsi que de donneurs sains. Les résultats ont montré une sensibilité et une spécificité diagnostique pour l'ensemble des maladies auto-immunes de 98,3% et de 93% respectivement.

Le diagnostic clinique ne doit pas se baser exclusivement sur le résultat de ce test, mais doit intégrer les données cliniques et de laboratoire.

NOTES

1. Éviter de toucher les cellules fixées dans les puits tout au long de la procédure.
2. Utiliser une pipette pour laver les lames, en évitant les contaminations entre les échantillons adjacents.

BIBLIOGRAPHIE

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, Cruvinel WM, Carvalho Francescantonio PL, Fritzler MJ, Garcia-De La Torre I, Herold M, Mimori T, Satoh M, von Mühlen CA and. Andrade LEC. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. *Frontiers in Immunology* 2015; 6: 1-13
3. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. En: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. Fritzler MJ, Rattner JB. Autoantibodies to the mitotic apparatus: biological breakthroughs, clinical application, etiological complexity. En: Konrad K, Humbel RL, Meurer M, Shonfeld Y and Tan EM, eds. Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity. Pabst Science Publishers, 2000.



ANTICORPOS ANTINUCLEARES HEP-2 (ANA-HEp-2)

Imunofluorescência Indirecta CÉLULAS HEP-2



A.MENARINI
diagnostics

COD 50059 20 x 12 det.

COD 50060 10 x 12 det.

Só para uso in vitro no laboratório clínico

UTILIZAÇÃO PREVISTA

Reagentes para a determinação qualitativa de anticorpos antinucleares em soro humano pelo método de imunofluorescência indirecta. Os resultados obtidos são úteis como auxílio no diagnóstico de diversas doenças autoimunes sistêmicas.

FUNDAMENTO DO MÉTODO

Os anticorpos antinucleares (ANA) do soro unem-se aos seus correspondentes antígenos presentes nas células HEP-2. Uma vez unidos, os anticorpos manifestam-se através da incubação com um anticorpo contra as imunoglobulinas humanas conjugado com fluoresceína e são visualizados por microscopia de fluorescência¹.

CONTEÚDO

		COD 50059	COD 50060
SLIDE	Lâminas	20 x 12 det.	10 x 12 det.
PBS	PBS (10x)	2 x 100 mL	-
CONTROL +	Contr. Posit. ANA- Ho	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Controlo Negativo	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	2 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Lamelas	1 x 12	-

COMPOSIÇÃO

- SLIDE** Células HEP2 cultivadas em cada poço.
- PBS** Fosfato de sódio 112,5 mmol/L, fosfato de potássio 30 mmol/L, cloreto sódico 1,15 mol/L, azida de sódio 0,95 g/L, pH 7,2.
- CONTROL+.** Soro humano com anticorpos antinucleares (ANA) padrão homogêneo, azida de sódio 0,95 g/L.
- CONTROL-.** Soro humano, azida de sódio 0,95 g/L.
- CONJUGATE** Anticorpos de cabra anti-imunoglobulinas IgG humanas conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), azul de Evans 0,01 g/L, azida de sódio 0,95 g/L
- MOUNT** Meio de Montagem: Mowiol 12%, Glicerol 30%, Tris 20 mmol/L, azida de sódio 0,95 g/L.

Os soros humanos utilizados na preparação do controlo negativo e o controlo positivo eram negativos para o antígeno HBs e para os anticorpos anti-HCV e anti-HIV. Não obstante, os controlos devem ser tratados com precaução como potencialmente infecciosos.

CONSERVAÇÃO

Conservar a 2-8°C.

Os reagentes são estáveis até à data de caducidade indicada na etiqueta sempre que se conservem bem fechados e se evite a contaminação durante o seu uso.

Indicações de deterioração:

- Componentes líquidos: Presença de partículas, turvação.
- Lâminas: Roturas no pacote contentor, defeitos macroscópicos como raladuras ou descolagens no cultivo das células.

REAGENTES AUXILIARES

PBS	PBS (10x).
CONJUGATE	IgG FITC/Evans.
MOUNT	Meio de Montagem.
CONTROL+.	Controlo Positivo ANA-Ho.
CONTROL+.	Controlo Positivo ANA-Sp: Soro humano com anticorpos antinucleares (ANA) padrão mosqueado, azida de sódio 0,95 g/L.
CONTROL+.	Controlo Positivo ANA-Nu: Soro humano com anticorpos antinucleares (ANA) padrão nucleolar, azida de sódio 0,95 g/L.
CONTROL+.	Controlo Positivo ANA-Ce: Soro humano com anticorpos antinucleares (ANA) padrão centrómero, azida de sódio 0,95 g/L.
CONTROL-.	Controlo Negativo.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

PBS: Efetuar uma diluição a 1/10 do Reagente B com água destilada. Estável 1 mês a 2-8°C se for conservado à temperatura recomendada, bem fechado e tendo cuidado para evitar contaminações durante a sua utilização.

Os outros componentes estão prontos a utilizar.

EQUIPAMENTO ADICIONAL

- Câmara húmida
- Cuvete de lavagem
- Microscópio de fluorescência equipado com filtros de excitação de 495 nm e de emissão de 525 nm para a visualização do FITC.

AMOSTRAS

Soro ou plasma recolhidos através de procedimentos standard. Estável uma semana a 2-8°C.

Diluir as amostras 1/80 em PBS (ver Preparação dos Reagentes) antes do ensaio.

Para a titulação de uma amostra positiva, realizar diluições duplas em PBS a partir da 1/160.

No entanto, cada laboratório deverá estabelecer o seu próprio exemplo de diluição baseado nas características da população.

PROCEDIMENTO

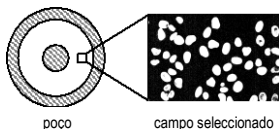
1. Temperar os reagentes e as amostras à temperatura ambiente.
2. Depositar uma gota (25 μ L) da amostra diluída ou dos Controlos nos poços da lâmina (A), tentar cobrir perfeitamente (Nota 1).
3. Incubar a lâmina na câmara húmida durante 30 minutos à temperatura ambiente (15-30°C).
4. Eliminar as gotas das amostras inclinando a lâmina e dar golpes suavemente. Evitar a mistura de soros.
5. Eliminar o soro restante na lâmina lavando-a com PBS (ver preparação do Reagente). (Nota 2).
6. Lavar a lâmina submergindo-a numa cuvette com PBS durante 5 minutos. Substituir o PBS e repetir a lavagem.
7. Secar cuidadosamente a lâmina utilizando o papel absorvente fornecido. El substrato deve permanecer sempre húmido.
8. Depositar uma gota do Reagente D em cada poço. Colocar a lâmina numa câmara húmida e incubar à temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos.

9. Lavar (ver passo 6) e secar (ver passo 7).

10. Depositar várias gotas do Reagente E sobre a lâmina e colocar uma lamela evitando a formação de bolhas de ar.

LEITURA

Examinar as células com um microscópio de fluorescência (250-400x). É recomendável realizar a leitura imediatamente. Para realizar a leitura, seleccionar os campos de observação da zona indicada no esquema, entre o centro e a periferia do poço. Seleccionar os campos com distribuição de células e intensidade de fluorescência uniformes. A intensidade da marcação da periferia ou do centro do poço não é representativa da preparação.



A observação da marcação fluorescente específica descrita seguidamente, indica um resultado positivo na diluição recomendada.

ANA: Existem diferentes padrões de fluorescência nucleares e citoplasmáticos que são considerados como um resultado positivo para o teste. Diferentes padrões podem coexistir no mesmo soro, podendo inclusivamente ser modificados com a diluição do mesmo. Os principais padrões antinucleares são descritos seguidamente, de acordo com a nomenclatura do ICAP (International Consensus on ANA Patterns)²:

AC-1 Nuclear homogéneo: Fluorescência homogénea e regular por todo nucleoplasma. Os nucléolos podem ser corados ou não, dependendo do substrato celular. Células em mitose (metáfase, anáfase e télofase) com cromatina corada intensamente de modo hialino homogéneo..

AC-3 Centrômero: Pontos grosseiros distintos (40-80 grânulos/célula) nas células em interfase e alinhados na placa de cromatina nas células em mitose. Ex. anti-CENP B.

AC-4 Nuclear flogranular: Fluorescência granular de aspecto fino em todo o nucleoplasma. Os nucléolos podem ser corados ou não. Células em mitose (metáfase, anáfase e télofase) apresentam placa não fluorescente. Ex. anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La.

AC-5 Nuclear Mosqueado: Nucleoplasma totalmente granular grosseiro pontilhado com pontos grosseiros. Os nucléolos podem ser corados ou não. Células em mitose (metáfase, anáfase e télofase) apresentam cromatina não fluorescente. Ex. Anti-Sm, anti-U1 RNP

AC-8 Nucleolar difuso: Fluorescência difusa de todo o nucléolo sem fluorescência da placa metafásica cromossómica. Ex. anti-PM-Scl, anti-Th/To

AC-9 Nucleolar Grumoso: Fluorescência dos nucléolos com contornos irregulares e dos corpos de Cajal com coloração peri-cromossómica da placa metafásica. Ex. antifibrilarina

AC-21 Citoplasmático flogranular sugestivo de AMA: Coloração granular grosseira estendendo-se a partir do citoplasma. Ex. anticorpos antimitocôndria

As amostras positivas podem ser tituladas. Define-se o título como a diluição maior que dá o resultado positivo.

Quando não se observar nenhuma das marcações específicas descritas, o resultado é negativo para os auto-anticorpos indicados.

CONTROLO DE QUALIDADE

O Controlo Positivo (CONTROL+) e o Controlo Negativo (CONTROL-) fornecidos com os kits cod 50059 devem ser ensaiados junto com as amostras dos pacientes para verificar a funcionalidade do procedimento de ensaio.

O Controlo Positivo (CONTROL+) deve proporcionar a marcação específica descrita no item anterior.

O Controlo Negativo (CONTROL-) não deve proporcionar nenhuma marcação específica.

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio programa de Controlo de Qualidade interna, assim como os procedimentos de correção no caso em que os controlos não cumpram com as tolerâncias aceitáveis.

CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO

O conjugado IgG FITC/Evans está calibrado face ao Padrão Internacional da OMS de anti-imunoglobulinas humanas de ovelha conjugadas com FITC.

A especificidade do Controlo Positivo ANA-Ho está verificada defronte ao soro de referência AF/CDC1 dos Centers for Disease Control.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

ANA: A determinação dos anticorpos antinucleares tem uma sensibilidade superior a 95% para o lúpus eritematoso sistémico, e uma baixa especificidade³.

- **Nuclear homogéneo (AC-1):** Indicativo de lúpus eritematoso sistémico.
- **Nuclear Mosqueado (AC-4, AC-5):** Associado ao lúpus eritematoso sistémico, doença mista do tecido conectivo, síndrome de Sjögren, polimiosite ou esclerodermia.
- **Nucleolar (AC-8, AC-9):** Em aproximadamente um 50-70% dos pacientes com solapamento de esclerodermia e polimiosite/dermatomiosite. Apresenta-se em até um 33% dos pacientes com esclerodermia sistémica, especialmente com complicações renais³.
- **Centrómero (AC-3):** Nos pacientes com esclerose sistémica, especialmente na forma da doença com implicação cutânea (80%). Ocasionalmente, em outras doenças conectivas⁴.
- **Citoplasmático finogranular sugestivo de AMA (AC-21):** Comum na Cirrose Biliar Primária, Esclerose Sistémica, raro em outras Doenças Autoimunes Reumáticas Sistémicas.

O kit Menarini de anticorpos anti-nucleares foi usado para determinar 140 soros de uma variedade de pacientes com doenças auto-imunes (lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, esclerodermia, síndrome de CREST, dermatopolimiosite, artrite reumatóide, hepatite auto-imune e cirrose biliar primária), assim como doadores sãos. Os resultados mostraram uma sensibilidade e especificidade de diagnóstico para o conjunto de doenças auto-imunes de 98,3% e 93%, respectivamente.

O diagnóstico clínico não se deve basear exclusivamente no resultado deste ensaio, senão que deve integrar os dados clínicos e de laboratório.

NOTAS

1. Evitar tocar as células do poço durante todo o procedimento.
2. Utilizar um frasco de lavagem ou uma pipeta para esta lavagem, evitando a possível contaminação com as amostras adjacentes.

BIBLIOGRAFIA

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, Cruvinel WM, Carvalho Francescantonio PL, Fritzler MJ, Garcia-De La Torre I, Herold M, Mimori T, Satoh M, von Mühlen CA and Andrade LEC. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. *Frontiers in Immunology* 2015; 6: 1-13
3. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. En: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. Fritzler MJ, Rattner JB. Autoantibodies to the mitotic apparatus: biological breakthroughs, clinical application, etiological complexity. En: Konrad K, Humbel RL, Meurer M, Shonfeld Y and Tan EM, eds. Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity. Pabst Science Publishers, 2000.

**ΑΤΝΙΠΥΡΗΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΗΕρ-2 (ANA- ΗΕρ-2)**

Εμμεσος Ανοσοφθορισμός ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΕρ-2

**A.MENARINI**
diagnostics

κωδ 50059 20 x 12 προσδιορισμοί

κωδ 50060 10 x 12 προσδιορισμοί

Μόνο για in vitro χρήση σε κλινικό εργαστήριο

ΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Αντιδραστήρια για τον ποιοτικό προσδιορισμό αντιπυρηνικών αντισωμάτων σε ανθρώπινο ορό με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται είναι χρήσιμα ως βοήθημα στη διάγνωση αρκετών συστηματικών αυτοάνοσων νόσων.

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) του ορού ενώνονται με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους, παρόντα στα κύτταρα ΗΕρ-2. Μετά την ένωση, τα αντισώματα εκδηλώνονται με επίωση με ένα αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με φθορισκίνη και είναι ορατά δια μικροσκοπίας φθορισμού¹.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ

		COD 50059	COD 50060
SLIDE	Πλακίδιο	20 x 12 προ.	10 x 12 προ.
PBS	PBS (10x)	2 x 100 mL	-
CONTROL +	Θετικός έλεγχος ANA- Ho	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Αρνητικός έλεγχος	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	2 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Κάλυμα	1 x 12	-

ΣΥΝΘΕΣΗ**SLIDE** Κύτταρα ΗΕρ2 καλλιεργημένα σε κάθε κοιλότητα.**PBS** Φωσφορικό νατρίου 112.5 mmol/L, φωσφορικό καλίου 30 mmol/L, χλωριούχο νάτριο 1.15 mol/L, αζίδιο νατρίου 0.95 g/L, pH 7.2.**CONTROL+** Ανθρώπινος ορός με ομοιογενές πρότυπο αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA), αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.**CONTROL-** Ανθρώπινος ορός, αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.**CONJUGATE** Αντισώματα αιγός ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης IgG συζευγμένα με ισοθειοκυανική φθορισκίνης (FITC), κυανό του Evans 0.01 g/L, αζίδιο νατρίου 0.95 g/L**MOUNT** Μέσο ζεύξης: Mowiol 12%, Γλυκερίνη 30%, Τρίς 20 mmol/L, αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

Οι ανθρώπινοι οροί που χρησιμοποιήθηκαν στην προετοιμασία του αρνητικού και του θετικού ελέγχου ήταν αρνητικοί για το αντιγόνο HBS και για τα αντισώματα αντι-VCH και αντι-VIH. Παρόλα αυτά, οι έλεγχοι θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή προς αποφυγή ενδοχόμενων μολύνσεων.

ΦΥΛΑΞΗ

Φύλαξη στους 2-8°C.

Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την αναγραφόμενη στην ετικέτα ημερομηνία λήξης, όταν φυλάσσονται καλά κλεισμένα και δεν επιμολύνονται κατά τη διάρκεια της χρήσης τους.

Ενδείξεις αλλοίωσης:

- Υγρά συστατικά: Εμφάνιση μικροσωματιδιακού υλικού, θολερότητα.
- Πλακίδιο: Σχισμές στη συσκευασία, μακροσκοπικά ελαττώματα όπως χαράξεις ή αποκολλήσεις στην καλλιέργεια των κυττάρων.

ΒΟΗΘΗΤΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

PBS PBS (10x).

CONJUGATE IgG FITC/Evans.

MOUNT Μέσο ζεύξης.

CONTROL+ Θετικός έλεγχος ANA-Ho.

CONTROL+ Θετικός Έλεγχος ANA-Sp: Ανθρώπινος ορός με αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) στικτό πρότυπο, αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

CONTROL+ Θετικός Έλεγχος ANA-Nu: Ανθρώπινος ορός με αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) πυρηνικό πρότυπο, αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

CONTROL+ Θετικός Έλεγχος ANA-Ce: Ανθρώπινος ορός με αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) κεντρομεριδικό πρότυπο, αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

CONTROL- Αρνητικός έλεγχος.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

PBS: Αραιώστε το Αντιδραστήριο Β σε αναλογία 1/10 με απεσταγμένο νερό. Σταθερό για 1 μήνα σε θερμοκρασία 2-8°C, εφόσον φυλάσσεται στη συνιστώμενη θερμοκρασία, καλά κλειστό, και δοθεί η δέουσα προσοχή ώστε να αποτραπεί τυχόν μόλυνση κατά τη διάρκεια της χρήσης.

Τα υπόλοιπα συστατικά παρέχονται έτοιμα προς χρήση.

ΠΡΟΣΘΕΤΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Υγρός θάλαμος
- Κυψελίδα πλύσης
- Μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρα διέγερσης των 495 nm και έκλυσης των 525 nm για την οπτική παρουσίαση του FITC.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Ορός ή πλάσμα που συλλέγονται με τις συνήθεις διαδικασίες. Σταθερό μία εβδομάδα στους 2-8°C.

Αραιώστε τα δείγματα 1/80 σε PBS (βλ. Προετοιμασία Αντιδραστηρίων) πριν από την εξέταση.

Για την τιλοποίηση ενός θετικού δείγματος, πραγματοποιήστε αραιώσεις διπλάς σε PBS πάνω από 1/160.

Κάθε εργαστήριο όμως, θα πρέπει να ορίσει το δικό του παράδειγμα αραιώσεως βασισμένο στα χαρακτηριστικά του πληθυσμού.

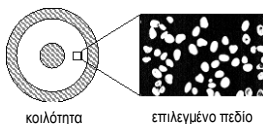
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Φέρτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Ρίξτε μία σταγόνα (25 μ L) του αραιωμένου δείγματος ή των Ελέγχων στις κοιλότητες του πλακιδίου (A), σκεπάζοντάς το εντελώς (Παρατήρηση 1).
3. Επώαστε το πλακίδιο σε υγρό θάλαμο για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C).
4. Απορρίψτε τις σταγόνες των δειγμάτων γέροντας το πλακίδιο και χτυπώντας το ελαφρά. Αποφύγετε την ανάμιξη ορών.
5. Απορρίψτε τα υπολείμματα ορού από το πλακίδιο ξεπλύνοντάς το με PBS (βλ. προετοιμασία Αντιδραστηρίων). (Παρατήρηση 2).
6. Πλύνετε το πλακίδιο βυθίζοντάς το σε μία κυψελίδα με PBS για 5 λεπτά. Αλλάξτε το PBS και επαναλάβετε την πλύση.
7. Στεγνώστε προσεκτικά το πλακίδιο με το ειδικό απορροφητικό χαρτί. Το υπόστρωμα πρέπει να παραμείνει πάντα υγρό.

8. Ρίξτε μια σταγόνα Αντιδραστήριου D σε κάθε κοιλότητα. Τοποθετήστε το πλακίδιο σε έναν υγρό θάλαμο και επλώστε σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C) για 30 λεπτά.
9. Πλύνετε (βλ. βήμα 6) και στεγνώστε (βλ. βήμα 7).
10. Ρίξτε μερικές σταγόνες Αντιδραστήριου E πάνω στο πλακίδιο και τοποθετήστε ένα κάλυμμα προσέχοντας να μη σχηματιστούν φυσαλίδες.

ΑΝΑΓΝΩΣΗ

Εξετάστε τα κύτταρα με ένα μικροσκόπιο φθορισμού (250-400x). Συνιστάται η ανάγνωση να πραγματοποιείται αμέσως. Για να πραγματοποιήσετε την ανάγνωση, επιλέξτε πεδία παρατήρησης της περιοχής που υποδεικνύεται στο σχήμα, μεταξύ του κέντρου και της περιφέρειας της κοιλότητας. Επιλέξτε πεδία με ομοιόμορφη κατανομή κυττάρων και ένταση φθορισμού. Η ένταση της χρώσης της περιφέρειας ή του κέντρου της κοιλότητας δεν είναι αντιπροσωπευτική της προετοιμασίας.



Η παρατήρηση της συγκεκριμένης χρώσης φθορισμού που περιγράφεται στη συνέχεια υποδεικνύει θετικό αποτέλεσμα στην προτεινόμενη αραίωση.

ANA: Υπάρχουν ποικίλα πυρηνικά και κυτταροπλασματικά φθορίζοντα πρότυπα που θεωρούνται ως θετικό αποτέλεσμα μιας δοκιμής ANA. Στον ίδιο ορό μπορούν να συνυπάρχουν ποικίλα πρότυπα τα οποία μπορούν μάλιστα να τροποποιηθούν με την διάλυση του ορού. Στη συνέχεια περιγράφονται τα κυριότερα αντιπυρηνικά πρότυπα, με βάση την ονοματολογία ICAP (International Consensus on ANA Patterns)²:

AC-1 Ομοιογενές πυρηνικό: Ομοιογενές και κανονικό φθορίζον πρότυπο διαμέσω όλου του πυρηνοπλάσματος. Οι πυρηνίσκοι μπορεί να χρωστούν ή όχι, ανάλογα με το κυτταρικό υπόστρωμα. Τα μιτωτικά κύτταρα (μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση) έχουν την μάζα της χρωματίνης έντονα φθορίζουσα με τρόπο ομοιογενή.

AC-3 Κεντρομερές: Κόκκοι μετρίου πάχους (40 – 80/κύτταρο) διάσπαρτοι στους πυρήνες των κυττάρων σε ενδιάμεση φάση και ευθυγραμμισμένοι στη μάζα της χρωματίνης στα μιτωτικά κύτταρα. Για παράδειγμα αντι-CENP-B.

AC-4 Πυρηνικό λεπτού κόκκου: Λεπτοί μικροσκοπικοί κόκκοι διαμέσω όλου του πυρηνοπλάσματος. Οι πυρηνίσκοι μπορεί να χρωστούν ή όχι. Τα μιτωτικά κύτταρα (μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση) έχουν την μάζα της χρωματίνης μη φθορίζουσα. Για παράδειγμα αντι-SS-A/Ro, αντι-SS-B/La

AC-5 Πυρηνικό παχέος/μεγάλου κόκκου: Παχείς κόκκοι διαμέσω όλου του πυρηνοπλάσματος. Οι πυρηνίσκοι μπορεί να χρωστούν ή όχι. Τα μιτωτικά κύτταρα (μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση) έχουν την μάζα της χρωματίνης μη φθορίζουσα. Για παράδειγμα αντι-Sm, αντι-U1 RNP

AC-8 Πυρηνικό ομοιογενές: Διάχυτος φθορισμός σε όλον τον πυρηνίσκο, ενώ η μεταφασική πλάκα δεν παρουσιάζει χρώση. Π.χ. Αντι-PM-Scl, αντι Th/Tz.

AC-9 Πυρηνικό θρομβώδες: Ακανόνιστη χρώση του πυρηνίσκου και σώματα του Cajal, με χρώση περιχρωσωματική στις μεταφασικές πλάκες. Π.χ. αντι-φιμπριλαρίνη.

AC-21 Κυτταροπλασματικό δικτυωτό /AAM: Χρώση παχέων κοκκωδών ινιδίων που εκτείνονται διαμέσω του πυρηνοπλάσματος. Π.χ. αντι-μιτοχονδριακά αντισώματα.

Τα θετικά αποτελέσματα μπορούν να τιτλοποιηθούν. Ως τίτλος ορίζεται μεγαλύτερη αραίωση που δίνει θετικό αποτέλεσμα.

Σε περίπτωση που δεν παρατηρείται καμία από τις συγκεκριμένες χρώσεις που περιγράφονται, το αποτέλεσμα είναι αρνητικό για τα υποδεικνύμενα αυτοαντισώματα.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο Θετικός Ελεγχος (CONTROL+) και ο Αρνητικός Ελεγχος (CONTROL-) που παρέχονται μαζί με τα kit κωδ 50059 θα πρέπει να ελεγχονται παράλληλα με τα δείγματα των ασθενών για την επαλήθευση της εγκυρότητας της ανάλυσης.

Ο Θετικός Ελεγχος (CONTROL+) θα πρέπει να παρουσιάζει τη συγκεκριμένη χρώση που περιγράφεται ανωτέρω.

Ο Αρνητικός Ελεγχος (CONTROL-) δεν πρέπει να παρουσιάζει καμία συγκεκριμένη χρώση.

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του σχήμα εσωτερικού Ποιοτικού Ελέγχου, καθώς και επιδιορθωτικές διαδικασίες για την περίπτωση που οι έλεγχοι δεν βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων.

ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το σύμπλοκο IgG FITC/Evans έχει μετρηθεί με βάση το Διεθνές Πρότυπο της Π.Ο.Υ. για ανθρώπινη αντι-οσοφαιρίνη από πρόβατα συζευγμένο με FITC.

Η ειδικότητα του Θετικού Ελέγχου ANA-Ho επαληθεύεται έναντι του ορού αναφοράς AF/CDC1 των Centers for Disease Control.

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

ANA: Ο προσδιορισμός των αντιπυρηνικών αντισωμάτων παρουσιάζει ευαισθησία υψηλότερη από 95% για τον διάχυτο ερυθρηματώδη λύκο, και χαμηλή ειδικότητα³.

- **Πυρηνικό ομοιογενές (AC-1):** Ενδεικτικό του συστημικού ερυθρηματώδη λύκου.
- **Πυρηνικό κοκκώδες (AC-4, AC-5):** Σχετίζεται με τον συστημικό ερυθρηματώδη λύκο, την μεικτή νόσο των συνδετικών ιστών, το σύνδρομο του Sjögren, την πολυμυοσίτιδα ή την σκληροδερμία.
- **Πυρηνικό (AC-8, AC-9):** Περίπου στο 50-70% ασθενών με αλληλοκάλυψη σκληροδερμίας ή πολυμυοσίτιδας/δερματομυοσίτιδας. Εμφανίζεται σε ποσοστό μέχρι 33% πασχόντων από διάχυτη σκληροδερμία, ειδικά με νεφρικές επιπλοκές³.
- **Κεντρομεριδικό (AC-3):** Σε πάσχοντες από διάχυτη σκλήρωση, κυρίως στη συνοδευόμενη από δερματικές επιπλοκές (80%). Σε ορισμένες περιπτώσεις, σε άλλες συνδετικές νόσους⁴.
- **Μιτοχονδριακό (AC-21):** Κοινό στην πρωτοπαθή χολική κίρρωση, γενικευμένη σκλήρυνση και σπάνιο σε άλλες συστημικές αυτοάνοσες νόσους.

Το kit αντιπυρηνικών αντισωμάτων Menarini χρησιμοποιήθηκε στον προσδιορισμό 140 ορών διαφορετικών ατόμων με αυτοάνοσες παθήσεις (διάχυτος ερυθρηματώδης λύκος, σύνδρομο Sjögren, σκληροδερμία, σύνδρομο CREST, δερματική πολυμυοσίτιδα, ρευματική αρθρίτιδα, αυτοάνοση ηπατίτιδα και πρωτοπαθής χολική κίρρωση), καθώς και υγιών δωρητών. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα για το σύνολο των αυτοάνοσων παθήσεων της τάξεως του 98,3% και 93%, αντίστοιχα.

Η κλινική διάγνωση δεν θα πρέπει να βασίζεται στο αποτέλεσμα μίας μόνο εξέτασης, αλλά να συνεκτιμά τόσο τα κλινικά όσο και τα εργαστηριακά δεδομένα.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

1. Μην αγγίζετε τα κύτταρα της κοιλότητας καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.
2. Χρησιμοποιείτε φιάλη πλύσης ή πιπέττα για αυτή την πλύση, αποφεύγοντας την πιθανή επιμόλυνση από τα παρακείμενα δείγματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, Cruvinel WM, Carvalho Francescantonio PL, Fritzier MJ, Garcia-De La Torre I, Herold M, Mimori T, Satoh M, von Mühlen CA and Andrade LEC. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. *Frontiers in Immunology* 2015; 6: 1-13
3. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. Fritzier MJ, Ratther JB. Autoantibodies to the mitotic apparatus: biological breakthroughs, clinical application, etiological complexity. In: Konrad K, Humbel RL, Meurer M, Shonfeld Y and Tan EM, eds. Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity. Pabst Science Publishers, 2000.



ANTI-NUCLEÄRE ANTIKÖRPER HEp-2 (ANA-HEp-2)

Indirekte Immunfluoreszenz HEp-2 Zellen



AMENARINI
diagnostics

COD 50059 20 x 12 Bestimmungen

COD 50060 10 x 12 Bestimmungen

In-vitro-Diagnostikum für das klinische Labor

VERWENDUNGSZWECK

Testreagenzien qualitativ zur Bestimmung von antinucleären Antikörpern in Humanserum mittels indirekter Immunfluoreszenz verwendet werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind als Hilfe bei der Diagnose mehrerer systemischer Autoimmunerkrankungen nützlich.

METHODENPRINZIP

Antinucleäre Antikörper (ANA) aus dem Serum binden an die entsprechenden Antigene, die auf der HEp-2 Zelle präsentiert werden. Der entstehende Antigen-Antikörperkomplex wird durch Fluorescein markierte Anti-human Immunglobuline nachgewiesen und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops¹ sichtbar gemacht.

INHALT

		COD 50059	COD 50060
SLIDE	Objektträger	20 x 12 Best.	10 x 12 Best.
PBS	PBS (10x)	2 x 100 mL	-
CONTROL +	ANA-Ho Posit. Kontrolle	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Negative Kontrolle	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	2 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Deckgläschen	1 x 12	-

ZUSAMMENSETZUNG

SLIDE kultivierte HEp-2 Zellen pro Auftragsstelle.

PBS Natrium phosphate 112.5 mmol/L, potassium phosphate 30 mmol/L, sodium chloride 1.15 mol/L, sodium azide 0.95 g/L, pH 7.2.

CONTROL+ Humanes Serum, das Antinucleäre Antikörper (ANA) mit homogenem Muster enthält, sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL- Humanes Serum, sodium azide 0.95 g/L.

CONJUGADO Ziege-Anti-humanes IgG Konjugat mit Fluorescein Isothiocyanate (FITC), Evans blue 0.01 g/L, sodium azide 0.95 g/L.

MOUNT Eindeckmedium: Mowiol 12%, Glycerol 30%, Tris 20 mmol/L, sodium azide 0.95 g/L.

Alle Seren humanen Ursprungs, die für die Herstellung von Negativ- oder Positivkontrollen benutzt wurden, sind auf Vorhandensein von HIV Antikörpern, HCV Antikörpern und HBs Antigen getestet worden und als negativ bewertet worden. Dennoch sollten alle Kontrollen als potentiell infektiös behandelt werden.

LAGERUNG

Lagerung bei 2-8°C.

Die Reagenzien sind bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar, wenn sie gut verschlossen gelagert werden und keine Verunreinigung während des Gebrauchs auftritt.

Hinweise zum Nichtgebrauch:

- Flüssige Bestandteile: Trübung oder Vorhandensein von Niederschlägen.
- Objektträger: Risse in der versiegelten Verpackung, makroskopisch sichtbare Defekte in der Zellkultur wie Kratzer oder Ablösen der Zellschicht.

ZUSATZREAGENZIEN

PBS PBS (10x).

CONJUGATE IgG FITC/Evans.

MOUNT Eindeckmedium.

CONTROL+ ANA-Ho positive Kontrolle.

CONTROL+ ANA-Sp Positive Kontrolle: Humanes Serum, das Antinucleäre Antikörper (ANA) gesprenkeltes Muster, sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL+ ANA-Nu Positive Control: Humanes Serum, das Antinucleäre Antikörper (ANA) nucleoläres Muster, sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL+ ANA-Ce Positive Control: Humanes Serum, das Antinucleäre Antikörper (ANA) zentromeres Muster, sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL- Negative Kontrolle.

REAGENZIVORBEREITUNG

PBS: Stellen Sie eine Verdünnung der Reagenz B 1/10 mit destilliertem Wasser her. Diese ist 1 Monat lang stabil, falls sie immer bei 2-8°C gelagert, dicht verschlossen gehalten und wenn sorgfältig darauf geachtet wird, jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- Feuchte Kammerr
- Wasch-Küvette
- Für das Sichtbarmachen der FITC Markierung wird ein Fluoreszenz Mikroskop mit einem Anregungsfilter von 495 nm und einem Emissionsfilter von 525 nm benötigt.

PROBEN

Für den Test kann Serum oder Plasma eingesetzt werden. Diese sollten innerhalb einer Woche verwendet werden und bei 2-8°C gelagert werden.

Die Proben werden 1/80 in PBS (siehe Vorbereitung der Reagenzien) vorverdünnt bevor sie in den Test eingesetzt werden. Für die weitere Titration positiver Proben, diese in zweifachen Verdünnungsschritten, ausgehend von 1/160 in PBS weiterverdünnen.

Jedes Labor muss jedoch ein eigenes Verdünnungsverhältnis ermitteln, das die Besonderheiten der Bevölkerungsstruktur berücksichtigt.

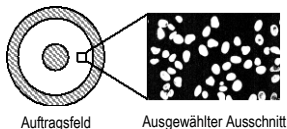
VERFAHREN

1. Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen.
2. Von den verdünnten Proben oder Kontrollen je einen Tropfen (25 μ L) auf ein Feld des Objektträgers (A) tropfen. Es ist wichtig, dass das Feld vollständig bedeckt ist (Anmerkung 1).
3. 30 min in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur (15-30°C) inkubieren.
4. Überschüssige Tropfen vorsichtig abschütteln, dabei Kreuz-Kontamination der Seren vermeiden.
5. Den Objektträger vorsichtig mit PBS (siehe Vorbereitung der Reagenzien) abspülen (Anmerkung 2).
6. Den Objektträger in einer mit PBS gefüllten Wasch-Küvette 5 min waschen. Das PBS wechseln und das Waschen wiederholen.
7. Den Objektträger mit Hilfe des mitgelieferten Blotting Papiers vorsichtig trocknen. Das Substrat darf nicht austrocknen

8. Einen Tropfen von Reagenz D auf jedes Feld auftragen. Den Objektträger dann für 30 min bei Raumtemperatur (15-30°C) in der Feuchtkammer inkubieren.
9. Wiederum waschen (Punkt 6) und trocknen (Punkt 7).
10. Einige Tropfen von Reagenz E auf den Objektträger geben und mit einem Deckglas abdecken, dabei das Bilden von Luftblasen vermeiden.

AUSWERTUNG

Den Objektträger mit einem Fluoreszenzmikroskop (250-400x) auswerten. Um optimale Ergebnisse zu erreichen sollte der Objektträger sofort abgelesen werden. Der Bereich, der zum Ablesen herangezogen werden sollte, ist in der Zeichnung verdeutlicht. Es sollte sich um einen Bereich zwischen Zentrum und Rand handeln. Die Fluoreszenz im Rand oder Zentrumsbereich gilt nicht als repräsentativ.



Die in der empfohlenen Verdünnung als spezifische beurteilte Fluoreszenz, sollte nach folgendem Mustern als positiv gewertet werden.

ANA: Es gibt verschiedene nukleäre und zytoplasmatische Fluoreszenzmuster, die als positives Testergebnis betrachtet werden. Verschiedene Muster können in ein und demselben Serum koexistieren und sich bei dessen Verdünnung sogar verändern. Nachfolgend werden die wichtigsten antinukleären Muster beschrieben, wobei die Nomenklatur des ICAP (International Consensus on ANA Patterns)² verwendet wird:

AC-1 Nukleär homogen: Gleichmäßig verteilte homogene Fluoreszenz des Nukleoplasmas. Die Kernkörperchen (Nukleolen) können in Abhängigkeit von der verwendeten HEp-2 Zelle angefärbt sein oder nicht. In mitotischen Zellen (Meta-, Ana- und Telophase) wird das Chromosomenmaterial intensiv hyalin angefärbt.

AC-3 Zentromer: Diskrete grosse Granula (40-80 pro Zelle) verteilt im Kern der Interphasezellen und ausgerichtet in der Region kondensierten Chromatins von mitotischen Zellen

AC-4 Nukleär fein gesprenkelt: Feine kleine Granula verteilt im gesamten Nukleoplasma. Die Kernkörperchen (Nukleolen) können angefärbt sein oder nicht. Keine Anfärbung des kondensierten Chromosomenmaterials mitotischer Zellen (Meta-, Ana-, Telophase).

AC-5 Nukleär grob gesprenkelt: Grobe Granula im gesamten Nukleoplasma. Kernkörperchen (Nukleolen) können angefärbt sein oder nicht. Keine Anfärbung des kondensierten Chromosomenmaterials mitotischer Zellen (Meta-, Ana-, Telophase).

AC-8 Homogen nukleolär: Diffuse Fluoreszenz der Kernkörperchen (Nukleolen). Das kondensierte Chromosomenmaterial der Metaphase-Zellen wird nicht angefärbt

AC-9 Schollig nukleolär: Unregelmäßige Anfärbung der Kernkörperchen (Nukleolen) und der Cajal-Körper mit einer peri-chromosomalen Anfärbung in mitotischen Zellen.

AC-21 Reticulär passend zu AMA: Grobgranuläre perlschnurartige Anfärbung im gesamten Zytoplasma.

Positive Seren sollten austitriert werden. Als Serum Titer wird die Verdünnung bezeichnet, bei der noch eine positive Fluoreszenz zu sehen ist. Wenn keine der beschriebenen Färbungen zu erkennen sind, sollte das Ergebnis als negativ für die Autoantikörper bezeichnet werden.

QUALITÄTS KONTROLLE

Die im Testkit cod 50059 enthaltene positive (CONTROL+) und negative Kontrolle (CONTROL-) sollten zusammen mit den Patientenseren angesetzt werden, um die Durchführung als gültig zu bezeichnen.

Die positive Kontrolle (CONTROL+) sollte die oben beschriebene spezifische Fluoreszenz liefern.

In der negativen Kontrolle (CONTROL-) sollte keine spezifische Färbung zu sehen sein.

Jedes Labor sollte sein eigenes internes Labor Qualitätsschema für die korrekte Durchführung aufstellen, falls Kontrollen nicht in der angegebenen Zeit reagieren sollten.

TEST CHARAKTERISIERUNG

Der IgG FITC/Evans Konjugat ist gegen Internationalen Muster der WHO von menschlichen Anti-immunoglobulin von Schaf kalibriert und mit FITC-Konjugiert.

Die Spezifität der ANA-Ho positiven Kontrolle wurde mit dem AF/CDC1 Referenzserum des Centers for Disease Control überprüft.

DIAGNOSTISCHE EIGENSCHAFTEN

ANA: Die Sensitivität der Bestimmung von antinucleären Antikörpern bei Systemischen Lupus Erythematosus ist höher als 95%, obwohl die Spezifität ziemlich niedrig ist³.

- **Nukleär Homogen (AC-1):** Hinweis für Systemischen Lupus Erythematosus.
- **Nukleär Gesprenkelt (AC-4, AC-5):** Enge Assoziation zu Systemischen Lupus Erythematosus, Connective Tissue Disease, Sjögren's Syndrom, Polymyositis oder Sklerodermie.
- **Nucleolär (AC-8, AC-9):** In ungefähr 50-70% der Patienten mit Überlappungssyndrom und Polymyositis/Dermatomyositis Syndrom beschrieben. Bis zu 33% werden diese Antikörper auch bei Patienten mit systemischer Sklerodermie, besonders mit Nierenbeteiligung³ beschrieben.
- **Zentromer (AC-3):** Bei Patienten mit Systemsklerose, besonders bei der Form, die auf die Haut beschränkt bleibt (80%). Gelegentlich auch bei einigen anderen Kollagenosen⁴.
- **Reticulär passend zu AMA (AC-21):** häufig bei primäre biliäre Leberzirrhose, selten bei Systemsklerose und anderen SARD.

Der Satz antinukleärer Antikörper Menarini wurde zur Untersuchung von 140 Seren einer Reihe von Patienten mit Autoimmunkrankheiten (Lupus erythematoses, Sjögren-Syndrom, Sklerodermien, CREST-Syndrom, Dermatopolymyositis, rheumatische Arthritis, Autoimmunhepatitis und primäre biliäre Leberzirrhose) sowie von gesunden Spendern eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten eine Empfindlichkeit und diagnostische Spezifität für den Komplex der Autoimmunerkrankungen von 98.3% bzw. 93%.

Die klinische Diagnose darf sich nicht allein auf das Ergebnis dieses Tests berufen, sondern muss alle klinischen und laboranalytischen Daten einbeziehen.

ANMERKUNGEN

1. Die fixierten Zellen auf dem Objektträger während der Durchführung nicht berühren.
2. Beim Waschen der Objektträger eine Spritzflasche oder eine Pipette verwenden, um Kreuzreaktionen der benachbarten Felder zu vermeiden.

LITERATUR

1. Melnickoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. En: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, Cruvinel WM, Carvalho Francescantonio PL, Fritzier MJ, Garcia-De La Torre I, Herold M, Mimori T, Satoh M, von Mühlen CA and Andrade LEC. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. *Frontiers in Immunology* 2015; 6: 1-13
3. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. Fritzier MJ, Rattner JB. Autoantibodies to the mitotic apparatus: biological breakthroughs, clinical application, etiological complexity. In: Konrad K, Humbel RL, Meurer M, Shonfeld Y and Tan EM, eds. Autoantigens and Autoantibodies: Diagnostic Tools and Clues to Understanding Autoimmunity. Pabst Science Publishers, 2000.

MANUFACTURER: BioSystems S.A.
PRODUTTORE: Costa Brava 30
FABRICANTE: 08030 Barcelona (Spain)
FABRICANT: Tel: +34 93 311 00 00
ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗΣ: Fax: +34 93 311 76 09
HERSTELLER: Mail: Biosystems@biosystems.es

DISTRIBUTOR: A. Menarini Diagnostics S.r.l.
DISTRIBUTORE: Via Lungo l'Ema,7
DISTRIBUIDOR: 50012 Bagno a Ripoli (Firenze)
DISTRIBUTEUR: Tel. 0039-055-5680-422/394
ΔΙΑΝΟΜΕΑΣ: Fax 0039-055-5680-905
HÄNDLER: