



AUTOANTIBODIES rKSL

Indirect Immunofluorescence RAT KIDNEY/STOMACH/LIVER



A.MENARINI
diagnostics

COD 50065 12 x 8 tests

COD 50052 12 x 8 tests

Only for *in vitro* use in the clinical laboratory

INTENDED USE

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

PRINCIPLE OF THE METHOD

Serum autoantibodies directed against the nucleus (ANA), the mitochondria (AMA), the smooth muscle (ASMA), the gastric parietal cell (APCA), the liver-kidney microsomes (LKM), the reticulin and others, bind to the corresponding antigens present in a preparation containing rat liver, kidney and stomach. 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 50065	COD 50052
SLIDE	Slides	12 x 8 tests	12 x 8 tests
PBS	PBS (10x)	1 x 100 mL	-
CONTROL +	AMA Positive Control	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Negative Control	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	1 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Coverslips	1 x 12	-

COMPOSITION

SLIDE Sections of rat liver, kidney and stomach.

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 anti-mitochondrial antibodies (AMA), 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 1%, Glycerol 87%, 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: Human serum containing anti-nuclear antibodies (ANA) homogeneous pattern, sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL + AMA Positive Control: Human serum containing anti-mitochondrial antibodies (AMA), sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL + ASMA Positive Control: Human serum containing anti-smooth muscle antibodies (ASMA), sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL + LKM Positive Control: Human serum containing anti-liver-kidney microsomal antibodies (LKM), sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL + APCA Positive Control: Human serum containing anti-parietal cell muscle antibodies (APCA), sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL – Negative Control.

REAGENT PREPARATION

PBS: Dilute PBS 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 1/20 in PBS (see Reagent Preparation) before the assay.

For titration of positive samples, make two-fold serial dilutions starting from 1/40 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 (50 μ L) of the diluted sample or Control on each slide 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 blotting paper. Keep the substrate moist along the procedure.

- Place 1 drop of Conjugate on each well. Incubate the slide for 30 minutes at room temperature (15-30°C) into a moist chamber.
- Wash (step 6) and dry (step 7).
- Place several drops of Mounting Medium on the slide and cover with a coverslip avoiding the formation of air bubbles.

READING

Examine the tissue section using the fluorescence microscope (250-400x). For best results, the slides should be read immediately, avoiding the center and the edge of the tissue.

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

ANA-homogenous: Homogeneous and uniform fluorescence throughout the nucleus of interphase cells. Strong fluorescence of mitotic cells.

AMA: Granular fluorescence of mitochondria in the cytoplasm of renal tubular cells.

ASMA: Staining of the muscularis mucosae, the muscle layers of the blood vessels and the interglandular fibers, in the rat stomach.

APCA: Reticular intracellular staining of parietal cells of rat gastric mucosa.

LKM: Type I. Strong staining of hepatocyte cytoplasm in liver and cytoplasm in proximal tubules in kidney. Negative distal tubules.

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 50065 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 low².

AMA: The presence of mitochondrial antibodies is associated with primary biliary cirrhosis in over than 95% of patients^{3,4}.

ASMA: Anti-smooth muscle antibodies are found in the sera of 52-85% of patients with autoimmune chronic active hepatitis and 22% of patients with primary biliary cirrhosis^{5,6}.

APCA: Antibodies to gastric parietal cells are found in 90% of patients with pernicious anemia, usually associated with other tissue specific autoimmune diseases⁷.

LKM: Anti-LKM type I antibodies are considered as markers of autoimmune hepatitis type II⁸.

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 tissue 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. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Leung PSC et al. Mitochondrial Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. MacKay IR, and Gershwin ME. The autoantibodies of primary biliary cirrhosis: clinico pathological correlations. In: Van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996.
5. Whittingham S and Mackay IR. Smooth muscle autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
6. Jacob G and Schoenfeld Y. Actin autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
7. Gleeson PA et al. Parietal Cell Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
8. Homberg JC, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. Hepatology 1987;7(6):1333-9.



AUTOANTICORPI rKSL

Immunofluorescenza Indiretta FEGATO/RENE/STOMACO DI RATTO



A.MENARINI
diagnostics

COD 50065 12 x 8 det.

COD 50052 12 x 8 det.

Solo per uso in vitro nel laboratorio clinico

USO PREVISTO

Reagenti per la determinazione di più autoanticorpi nel siero umano. I risultati ottenuti sono utili come ausilio nella diagnosi e nel monitoraggio delle malattie autoimmuni.

PRINCIPIO DEL METODO

Gli autoanticorpi del siero diretti contro il nucleo (ANA), i mitocondri (AMA), il muscolo liscio (ASMA), le cellule parietali gastriche (APCA), i microsomi de fegato-rene (LKM), la reticolina ed altro, si legano ai corrispondenti antigeni presenti nella preparazione contenente fegato, rene e stomaco di ratto. Il complesso antigene-anticorpo risultante viene rilevato mediante l' incubazione con un anticorpo anti-immunoglobuline umane coniugato con fluoresceina e visualizzato mediante microscopia in fluorescenza¹.

CONTENUTO

		COD 50065	COD 50052
SLIDE	Vetrini	12 x 8 det.	12 x 8 det.
PBS	PBS (10x)	1 x 100 mL	-
CONTROL +	Cont. Posit. AMA	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Controllo Negativo	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	1 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Vetrini coprioggetto	1 x 12	-

COMPOSIZIONE

SLIDE Sezioni di fegato, rene e stomaco di ratto.

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 anti-mitocondrio (AMA), 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 1%, Glicerolo 87%, 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, iControlli 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: Siero umano con anticorpi anti-nucleo (ANA) pattern omogeneo, azide di sodio 0,95 g/L.

CONTROL + Controllo Positivo AMA: Siero umano con anticorpi anti-mitocondrio (AMA), azide di sodio 0,95 g/L.

CONTROL + Controllo Positivo ASMA: Siero umano con anticorpi anti-muscolo liscio (ASMA), azide di sodio 0,95 g/L.

CONTROL + Controllo Positivo LKM: Siero umano con anticorpi anti-fegato-rene microsomici (LKM), azide di sodio 0,95 g/L.

CONTROL + Controllo Positivo APCA: Siero umano con anticorpi anti-cellule parietali (APCA), azide di sodio 0,95 g/L.

CONTROL- Controllo Negativo.

PREPARAZIONE DEI REATTIVI

PBS: Effettuare una diluizione 1/10 del PBS 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 1/20 in PBS (vedere Preparazione dei Reattivi) prima del test.

Per la titolazione di un campione positivo, realizzare diluizioni doppie in PBS a partire da 1/40.

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 (50 µL) di campione diluito o dei Controlli nei pozzetti del vetrino, 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 Conjugate 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 Mounting Medium sopra il vetrino e porre un coprioggetti evitando la formazione di bolle d'aria.

LETTURA

Esaminare la sezione di tessuto con un microscopio a fluorescenza (250-400x). Si consiglia di effettuare immediatamente la lettura, evitando il centro e il bordo del tessuto.

Il rilevamento delle marcature fluorescenti specifiche di cui appresso, indica un risultato positivo alla diluizione consigliata.

ANA-omogeneo: Fluorescenza uniforme e omogenea in tutto l'interno del nucleo della cellula in interfase. Fluorescenza intensa nelle cellule in mitosi.

AMA: Fluorescenza granulare dei mitocondri nel citoplasma delle cellule tubulari renali.

ASMA: Marcaggio della mucosa muscolare, le estremità del muscolo dei vasi sanguigni e le fibre interglondolari, nello stomaco di ratto.

APCA: Marcaggio reticolare intracellulare delle cellule parietali della mucosa gastrica di ratto.

LKM: Tipo I. Fluorescenza citoplasmatica degli epatociti e del citoplasma dei tubuli prossimali del rene. Tubuli distali negativi.

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 50065 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 specificità².

AMA: La presenza di anticorpi anti-mitocondrio è associata a cirrosi biliare primaria in circa il 95% dei pazienti^{3,4}.

ASMA: Gli anticorpi anti-muscolo liscio si riscontrano nel siero di un 52-85% di pazienti con epatite attiva cronica autoimmune e in un 22% di pazienti con cirrosi biliare primaria^{5,6}.

APCA: Gli anticorpi anti-cellule parietali si riscontrano in un 90% di pazienti con anemia perniziosa, associata normalmente con altre malattie autoimmuni specifiche di tessuto⁷.

LKM: Gli anticorpi anti-LKM del tipo I sono considerati come indicatori dell'epatite autoimmune del tipo II⁸.

La diagnosi clinica non può essere fatta tenendo conto del risultato di un unico test, ma deve integrare i 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. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Leung PSC et al. Mitochondrial Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. MacKay IR, and Gershwin ME. The autoantibodies of primary biliary cirrhosis: clinico pathological correlations. In: Van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996.
5. Whittingham S and Mackay IR. Smooth muscle autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
6. Jacob G and Schoenfeld Y. Actin autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
7. Gleeson PA et al. Parietal Cell Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
8. Homberg JC, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. Hepatology 1987;7(6):1333-9.



AUTOANTICUERPOS rKSL

Inmunofluorescencia Indirecta HÍGADO/RIÑÓN/ESTÓMAGO DE RATA



A.MENARINI
diagnostics

COD 50065 12 x 8 det.

COD 50052 12 x 8 det.

Sólo para uso in vitro en el laboratorio clínico

USO PREVISTO

Reactivos para la determinación de múltiples autoanticuerpos en suero humano. Los resultados obtenidos son útiles como ayuda en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades autoinmunes.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los autoanticuerpos del suero dirigidos contra el núcleo (ANA), las mitocondrias (AMA), el músculo liso (ASMA), las células parietales gástricas (APCA), los microsomas de hígado-riñón (LKM), la reticulina y otros, se unen a sus correspondientes antígenos presentes en la preparación que contiene hígado, riñón y estómago de rata. El complejo antígeno-anticuerpo resultante se detecta mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas humanas conjugado con fluoresceína y visualizado por microscopía de fluorescencia¹.

CONTENIDO

		COD 50065	COD 50052
SLIDE	Portaobjetos	12 x 8 det.	12 x 8 det.
PBS	PBS (10x)	1 x 100 mL	-
CONTROL +	Cont. Posit. AMA	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Control Negativo	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	1 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Cubreobjeto	1 x 12	-

COMPOSICIÓN

SLIDE Secciones de hígado, riñón y estómago de rata.

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 anti-mitocondriales (AMA), 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 1%, Glicerol 87%, 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: Suero humano con anticuerpos anti-nucleares (ANA) patrón homogéneo, azida de sodio 0,95 g/L.

CONTROL+ Suero humano con anticuerpos anti-mitocondriales (AMA), azida de sodio 0,95 g/L.

CONTROL+ Control Positivo ASMA: Suero humano con anticuerpos anti-músculo liso (ASMA), azida de sodio 0,95 g/L.

CONTROL+ Control Positivo LKM: Suero humano con anticuerpos anti-hígado-riñón microsomal (LKM), azida de sodio 0,95 g/L.

CONTROL+ Control Positivo APCA: Suero humano con anticuerpos anti-células parietales (APCA), azida de sodio 0,95 g/L.

CONTROL- Control Negativo.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

PBS: Efectuar una dilución 1/10 del PBS 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 1/20 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 1/40.

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 (50 μ L) de la muestra diluida o de los Controles en los pocillos del portaobjetos, 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 Conjugate 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 Mounting Medium sobre el portaobjetos y colocar un cubreobjetos procurando evitar la formación de burbujas de aire.

LECTURA

Examinar la sección de tejido con un microscopio de fluorescencia (250-400x). Es recomendable realizar la lectura de inmediato, evitando el centro y el borde del tejido.

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

ANA-homogéneo: Fluorescencia uniforme y homogénea en todo el interior del núcleo de la célula en interfase. Fluorescencia intensa en las células en mitosis.

AMA: Fluorescencia granular de las mitocondrias en el citoplasma de las células tubulares renales.

ASMA: Marcaje de la mucosa muscular, las capas de músculo de los vasos sanguíneos y las fibras interglandulares, en el estómago de rata.

APCA: Marcaje reticular intracelular de las células parietales de la mucosa gástrica de rata.

LKM: Tipo I. Marcaje intenso del citoplasma del hepatocito en el hígado y del citoplasma de los túbulos proximales en el riñón. Túbulos distales negativos.

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 50065 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 especificidad².

AMA: La presencia de anticuerpos anti-mitocondriales se asocia con cirrosis biliar primaria por encima del 95% de pacientes^{3,4}.

ASMA: Los anticuerpos anti-músculo liso se encuentran en el suero de un 52-85% de pacientes con hepatitis activa crónica autoinmune y en un 22% de pacientes con cirrosis biliar primaria^{5,6}.

APCA: Los anticuerpos anti-células parietales se encuentran en un 90% de pacientes con anemia perniciosa, asociada normalmente con otras enfermedades autoinmunes específicas de tejido⁷.

LKM: Los anticuerpos anti-LKM tipo I se consideran marcadores de la hepatitis autoinmune tipo II⁸.

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. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Leung PSC et al. Mitochondrial Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. MacKay IR, and Gershwin ME. The autoantibodies of primary biliary cirrhosis: clinico pathological correlations. In: Van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996.
5. Whittingham S and Mackay IR. Smooth muscle autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
6. Jacob G and Schoenfeld Y. Actin autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
7. Gleeson PA et al. Parietal Cell Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
8. Homberg JC, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. Hepatology 1987;7(6):1333-9.



AUTOANTICORPS rKSL

Immunofluorescence Indirecte FOIE/REIN/ESTOMAC DE RAT



A.MENARINI
diagnostics

COD 50065 12 x 8 tests

COD 50052 12 x 8 tests

A utiliser uniquement in vitro dans les laboratoires cliniques

USAGE PRÉVU

Réactifs pour la détermination de plusieurs autoanticorps dans le sérum humain. Les résultats obtenus sont utiles pour aider à diagnostiquer et à surveiller les maladies auto-immunes.

PRINCIPE DE LA METHODE

Les auto-anticorps de sérum dirigés contre le noyau (ANA), la mitochondrie (AMA), le muscle lisse (ASMA), la cellule pariétale gastrique (APCA), les microsomes de foie et de rein (LKM), la réticuline et d'autres, se lient aux antigènes correspondants présents dans une préparation contenant du foie, du rein et de l'estomac de rat. 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 50065	COD 50052
SLIDE	Lames	12 x 8 tests	12 x 8 tests
PBS	PBS (10x)	1 x 100 mL	-
CONTROL +	Contrôle Positif AMA	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Contrôle Négatif	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	1 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Couvre-lames	1 x 12	-

COMPOSITION

SLIDE Coupes de foie, de rein et d'estomac de rat.

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 anti-mitochondrie (AMA), 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 1%, Glycérol 87%, 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 décollages de la monocouche.

REACTIFS SUPPLEMENTAIRES

PBS PBS (10x).

CONJUGATE IgG FITC/Evans.

MOUNT Milieu de Montage.

CONTROL+ Contrôle Positif ANA-Ho: Sérum humain contenant des anticorps anti-nucléaire (ANA) de profil homogène, azide de sodium 0,95 g/L.

CONTROL+ Contrôle Positif AMA: Sérum humain contenant des anticorps anti-mitochondrie (AMA), azide de sodium 0,95 g/L.

CONTROL+ Contrôle Positif ASMA: Sérum humain contenant des anticorps anti-muscle lisse (ASMA), azide de sodium 0,95 g/L.

CONTROL+ Contrôle Positif LKM: Sérum humain contenant des anticorps anti-microsomes de foie et de rein (LKM), azide de sodium 0,95 g/L.

CONTROL+ Contrôle Positif APCA: Sérum humain contenant des anticorps anti-cellule pariétale (APCA), azide de sodium 0,95 g/L.

CONTROL- Contrôle négatif.

PREPARATION DU REACTIF

PBS: Effectuer une dilution 1/10 du PBS 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 1/20 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 1/40 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 (50 µL) de l'échantillon dilué ou du Contrôle dans chaque puits de la lame, 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 Conjugate 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 Mounting Medium sur la lame et la recouvrir avec un couvre-lame en évitant la formation de bulles d'air.

LECTURE

Examiner la section de tissu avec un microscope à fluorescence (250-400x). Il est recommandé de réaliser la lecture immédiatement, en évitant le centre et le bord du tissu.

L'observation du marquage fluorescent spécifique décrit ci-dessous indique un résultat positif à la dilution recommandée.

ANA-homogène: Fluorescence homogène et uniforme de tout le noyau des cellules en interphase. Forte fluorescence des cellules en mitose.

AMA: Fluorescence granulaire des mitochondries dans le cytoplasme des cellules rénales tubulaires.

ASMA: Marquage de la musculaire-muqueuse, des couches musculaires des vaisseaux sanguins, et des fibres inter-glandulaires, dans l'estomac de rat.

APCA: Marquage réticulaire intracellulaire des cellules pariétales de la muqueuse gastrique de rat.

LKM: Type I. Marquage intense du cytoplasme des hépatocytes du foie et marquage du cytoplasme des tubules proximaux du rein. Tubules distaux négatifs.

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 50065 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 de la détermination des anticorps antinucléaire est supérieure à 95% pour le lupus érythémateux systémique, bien que la spécificité soit plus faible².

AMA: La présence d'anticorps anti-mitochondrie est commune chez plus de 95% des patients atteints de cirrhose biliaire primitive et chez moins de 40% des patients atteints de sclérodémie^{3,4}.

ASMA: Des anticorps anti-muscle lisse sont trouvés dans les sérums de 52-85% des patients atteints d'hépatite active chronique auto-immune et 22% des patients atteints de cirrhose biliaire primitive^{5,6}.

APCA: Des anticorps contre les cellules pariétales gastriques sont trouvés chez 90% des patients atteints d'anémie pernicieuse, habituellement associée à d'autres maladies auto-immunes tissu spécifiques⁷.

LKM: Des anticorps anti-LKM du type I sont considérés comme marqueurs d'hépatite autoimmune de type II^o.

Le diagnostic clinique ne doit pas être basé sur un test unique mais il doit intégrer l'ensemble des données cliniques et du laboratoire.

NOTES

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

BIBLIOGRAPHIE

1. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Leung PSC et al. Mitochondrial Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. MacKay IR, and Gershwin ME. The autoantibodies of primary biliary cirrhosis: clinico pathological correlations. In: Van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996.
5. Whittingham S and Mackay IR. Smooth muscle autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
6. Jacob G and Schoenfeld Y. Actin autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
7. Gleeson PA et al. Parietal Cell Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
8. Homberg JC, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology* 1987;7(6):1333-9.



AUTOANTICORPI rKSL

Imunofluorescência Indirecta FEGATO/RENE/STOMACO DI RATTO



A. MENARINI
diagnostics

COD 50065 12 x 8 det.

COD 50052 12 x 8 det.

Só para uso in vitro no laboratório clínico

UTILIZAÇÃO PREVISTA

Reagentes para a determinação de múltiplos autoanticorpos no soro humano. Os resultados obtidos são úteis como um auxiliar no diagnóstico e monitorização de doenças autoimunes.

FUNDAMENTO DO MÉTODO

Gli autoanticorpi del siero diretti contro il nucleo (ANA), i mitocondri (AMA), il muscolo liscio (ASMA), le cellule parietali gastriche (APCA), i microsomi de fegato-rene (LKM), la reticolina ed altro, si legano ai corrispondenti antigeni presenti nella preparazione contenente fegato, rene e stomaco di ratto. Il complesso antigene-anticorpo risultante viene rilevato mediante l' incubazione con un anticorpo anti-immunoglobuline umane coniugato con fluoresceina e visualizzato mediante microscopia in fluorescenza¹.

CONTEÚDO

		COD 50065	COD 50052
SLIDE	Lâminas	12 x 8 det.	12 x 8 det.
PBS	PBS (10x)	2 x 100 mL	-
CONTROL +	Contr. Posit. AMA	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Controlo Negativo	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	1 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Lamelas	1 x 12	-

COMPOSIÇÃO

SLIDE Seções de fegato, rene e stomaco di ratto.

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+. Siero umano con anticorpi anti-mitocondrio (AMA), azide de sodio 0,95 g/L.

CONTROL-. Soro humano, azida de sódio 0,95 g/L.

CONJUGATE Anticorpos de cabra anti-immunoglobulinas 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 1%, Glicerol 87%, 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: Siero umano con anticorpi anti-nucleo (ANA) pattern omogeneo, azide di sodio 0,95 g/L.

CONTROL+. Controlo Positivo AMA: Siero umano con anticorpi anti-mitocondrio (AMA), azide di sodio 0,95 g/L.

CONTROL+. Controlo Positivo ASMA: Siero umano con anticorpi anti-muscolo liscio (ASMA), azide di sodio 0,95 g/L.

CONTROL+. Controlo Positivo LKM: Soro humano com anticorpo antifigado-rim microssómico (LKM), azida de sódio 0,95 g/L.

CONTROL+. Controlo Positivo APCA: Soro humano com anticorpos anticélulas parietais (APCA), azida de sódio 0,95 g/L.

CONTROL-. Controlo Negativo.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

PBS: Efetuar uma diluição a 1/10 do PBS 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 1/20 em PBS (ver Preparação dos Reagentes) antes do ensaio.

Para a titulação de uma amostra positiva, realizar diluições duplas em PBS a partir da 1/40.

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 (50 μ L) da amostra diluída ou dos Controlos nos poços da lâmina, 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 cuvete 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 Conjugate 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 Mounting Medium sobre a lâmina e colocar uma lamela evitando a formação de bolhas de ar.

LEITURA

Esaminare la sezione di tessuto con un microscopio a fluorescenza (250-400x). Si consiglia di effettuare immediatamente la lettura, evitando il centro e il bordo del tessuto.

Il rilevamento delle marcature fluorescenti specifiche di cui appresso, indica un risultato positivo alla diluizione consigliata.

ANA-omogeneo: Fluorescenza uniforme e omogenea in tutto l' interno del nucleo della cellula in interfase. Fluorescenza intensa nelle cellule in mitosi.

AMA: Fluorescenza granulare dei mitocondri nel citoplasma delle cellule tubulari renali.

ASMA: Marcaggio della mucosa muscolare, le estremità del muscolo dei vasi sanguigni e le fibre interglandolari, nello stomaco di ratto.

APCA: Marcaggio reticolare intracellulare delle cellule parietali della mucosa gastrica di ratto.

LKM: Tipo I. Fluorescenza citoplasmatica degli epatociti e del citoplasma dei tubuli prossimali del rene. Tubuli distali negativi.

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.

CONTROLO DE QUALIDADE

O Controlo Positivo (CONTROL+) e o Controlo Negativo (CONTROL-) fornecidos com os kits cod 50065 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 de frente ao soro de referência AF/CDC1 dos Centers for Disease Control.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

ANA: La determinazione degli anticorpi anti-nucleo ha una sensibilità superiore al 95% per il lupus eritematoso sistemico, e una bassa specificità².

AMA: La presenza di anticorpi anti-mitocondrio è associata a cirrosi biliare primaria in circa il 95% dei pazienti^{3,4}.

ASMA: Gli anticorpi anti-muscolo liscio si riscontrano nel siero di un 52-85% di pazienti con epatite attiva cronica autoimmune e in un 22% di pazienti con cirrosi biliare primaria^{5,6}.

APCA: Gli anticorpi anti-cellule parietali si riscontrano in un 90% di pazienti con anemia perniciosa, associata normalmente con altre malattie autoimmuni specifiche di tessuto⁷.

LKM: Gli anticorpi anti-LKM del tipo I sono considerati come indicatori dell'epatite autoimmune del tipo II⁸.

La diagnosi clinica non può essere fatta tenendo conto del risultato di un unico test, ma deve integrare i dati clinici e di laboratorio.

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. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Leung PSC et al. Mitochondrial Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. MacKay IR, and Gershwin ME. The autoantibodies of primary biliary cirrhosis: clinico pathological correlations. In: Van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996.
5. Whittingham S and Mackay IR. Smooth muscle autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
6. Jacob G and Schoenfeld Y. Actin autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
7. Gleeson PA et al. Parietal Cell Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
8. Homberg JC, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. Hepatology 1987;7(6):1333-9.



ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ rKSL

Εμμεσος Ανοσοφθορισμός ΗΠΑΡ/ΝΕΦΡΟ/ΣΤΟΜΑΧΙ ΜΥΟΣ



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 προσδιορισμό πολλαπλών αυτοαντισωμάτων στον ανθρώπινο ορό. Τα αποτελέσματα χρησιμοποιούνται ως βοήθημα στη διάγνωση και παρακολούθηση αυτοάνοσων παθήσεων.

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα αυτοαντισώματα του ορού κατά του πυρήνα (ANA), των μιτοχονδρίων (AMA), των λείων μυών (ASMA), των τοιχωματικών γαστρικών κυττάρων (APCA), τα μικροσώματα ήπατος-νεφρού (LKM), της ρετικούλης και άλλων, ενώνονται με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους, παρόντα στην προετοιμασία που περιέχει ήπαρ, νεφρό και στομάχι μύος. Το παραγόμενο σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος εκδηλώνεται με επώαση με ένα αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με φθορισκίνη και είναι ορατό δια μικροσκοπίας φθορισμού¹.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ

		COD 50065	COD 50052
SLIDE	Πλακίδιο	12 x 8 προ.	12 x 8 προ.
PBS	PBS (10x)	1 x 100 mL	-
CONTROL +	Θετικός έλεγχος AMA	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Αρνητικός έλεγχος	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	1 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Κάλυμα	1 x 12	-

ΣΥΝΘΕΣΗ

SLIDE Τομές ήπατος, νεφρού και στομάχου μύος.

PBS Φωσφορικό νάτριου 112.5 mmol/L, φωσφορικό καλίου 30 mmol/L, χλωριούχο νάτριο 1.15 mol/L, αζίδιο νάτριου 0.95 g/L, pH 7.2.

CONTROL+ Ανθρώπινος ορός με αντι-μιτοχονδριακά αντισώματα (AMA), αζίδιο νάτριου 0.95 g/L.

CONTROL- Ανθρώπινος ορός, αζίδιο νάτριου 0.95 g/L.

CONJUGATE Αντισώματα αιγός ανθρώπινης αντι-ανοσοσφαιρίνης IgG συζευγμένα με ισοθειοκυανική φθορισκίνης (FITC), κυανό του Evans 0.01 g/L, αζίδιο νάτριου 0.95 g/L

MOUNT Μέσο ζεύξης: Mowiol 1%, Γλυκερίνη 87%, Tris 20 mmol/L, αζίδιο νάτριου 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 ενδεχομένων 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-Ηο: Ανθρώπινος ορός με αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) ομοιογενές πρότυπο, αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

CONTROL+ Θετικός Έλεγχος AMA: Ανθρώπινος ορός με αντι-μιτοχονδριακά αντισώματα (AMA), αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

CONTROL+ Θετικός Έλεγχος ASMA: Ανθρώπινος ορός με αντισώματα αντι-μείος μυς (ASMA), αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

CONTROL+ Θετικός Έλεγχος LKM: Ανθρώπινος ορός με αντισώματα κατά του συκωτιού και του νεφρού μικροσωματικό (LKM), αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

CONTROL+ Θετικός Έλεγχος APCA: Ανθρώπινος ορός με αντισώματα κατά των βρεγματικών κυττάρων (APCA), αζίδιο νατρίου 0.95 g/L.

CONTROL- Αρνητικός έλεγχος.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

PBS: Αραιώστε το PBS 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 1/20 σε PBS (βλ. Προετοιμασία Αντιδραστηρίων) πριν από την εξέταση.

Για την πλοποίηση ενός θετικού δείγματος, πραγματοποιήστε αραιώσεις διπλές σε PBS πάνω από 1/40.

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

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Φέρτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Ρίξτε μία σταγόνα (50 μL) του αραιωμένου δείγματος ή των Ελέγχων στις κοιλότητες του πλακιδίου, σκεπάζοντάς το εντελώς (Παρατήρηση 1).
3. Επλώστε το πλακίδιο σε υγρό θάλαμο για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C).
4. Απορρίψτε τις σταγόνες των δειγμάτων γέρνοντας το πλακίδιο και χτυπώντας το ελαφρά. Αποφύγετε την ανάμιξη ορών.
5. Απορρίψτε τα υπολείμματα ορού από το πλακίδιο ξεπλένοντάς το με PBS (βλ. προετοιμασία Αντιδραστηρίου). (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 Conjugate σε κάθε κοιλότητα. Τοποθετήστε το πλακίδιο σε έναν υγρό θάλαμο και επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C) για 30 λεπτά.
9. Πλύνετε (βλ. βήμα 6) και στεγνώστε (βλ. βήμα 7).
10. Ρίξτε μερικές σταγόνες Mounting Medium πάνω στο πλακίδιο και τοποθετήστε ένα κάλυμμα προσέχοντας να μη σχηματιστούν φυσαλίδες.

ΑΝΑΓΝΩΣΗ

Εξετάστε την τομή του ιστού με ένα μικροσκόπιο φθορισμού (250-400x). Συνιστούμε να πραγματοποιήσετε την ανάγνωση αμέσως, αποφεύγοντας το κέντρο και το άκρο του ιστού.

Η παρατήρηση της εξειδικευμένης σήμανσης φθορισμού που περιγράφεται στη συνέχεια υποδεικνύει ένα θετικό αποτέλεσμα στη συνιστώμενη διάλυση.

ANA-ομοιογενές: Ομοιόμορφος και ομοιογενής φθορισμός σε όλο το εσωτερικό του πυρήνα του κυττάρου σε ενδιάμεση φάση. Εντονος φθορισμός στα κύτταρα σε μίτωση.

AMA: Κοκκιώδης φθορισμός των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα των νεφρικών σωληνωειδών κυττάρων.

ASMA: Χρώση της μυϊκής βλεννογόνου, των μυϊκών στρωμάτων των αιμοφόρων αγγείων και των δι-αδενικών ινών στο στομάχι μύος.

APCA: Ενδοκυτταρική δικτυωτή χρώση των τοιχωματικών κυττάρων της γαστρικής βλεννογόνου μούς.

LKM: Τύπος I. Έντονη χρώση του κυτταροπλάσματος των ηπατοκυττάρων στο ήπαρ και του κυτταροπλάσματος των εγγείων σωληναρίων στο νεφρό. Αρνητικά άπυ σωληνάκια.

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

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

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο Θετικός Ελεγχος (CONTROL+) και ο Αρνητικός Ελεγχος (CONTROL-) που παρέχονται μαζί με τα kit κωδ 50065 θα πρέπει να ελέγχονται 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-ανοσοσφαιρίνη από πρόβατα συζευγμένο με FITC.

Η ειδικότητα του Θετικού Ελέγχου ANA-Ηο 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 ερυθριματώδη λύκο, και χαμηλή ειδικότητα².

AMA: Η παρουσία αντι-μιτοχονδριακών αντισωμάτων συνδέεται με το πρωτογενές σύνδρομο Caroli-Nora σε πάνω από το 95% των ασθενών^{2,3}.

ASMA: Τα αντισώματα αντι-λεϊός μιν παρουσιάζονται στον ορό του 52-85% των πασχόντων από χρόνια αυτοάνοση ενεργή ηπατίτιδα και του 22% των πασχόντων από πρωτογενές σύνδρομο Caroli-Nora^{5,6}.

APCA: Τα αντισώματα αντι-τοιχωματικά γαστρικά κύτταρα παρουσιάζονται στο 90% όσων πάσχουν από κακοήγη αναιμία, σχετιζόμενη συνήθως με άλλες αυτοάνοσες νόσους χαρακτηριστικές των ιστών ⁷.

LKM: Τα αντισώματα αντι-LKM τύπου I θεωρούνται ενδεικτικά της αυτοάνοσης ηπατίτιδας τύπου II⁸.

Η κλινική διάγνωση δεν θα πρέπει να βασίζεται στο αποτέλεσμα μιας 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. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Leung PSC et al. Mitochondrial Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. MacKay IR, and Gershwin ME. The autoantibodies of primary biliary cirrhosis: clinico pathological correlations. In: Van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996.
5. Whittingham S and Mackay IR. Smooth muscle autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
6. Jacob G and Schoenfeld Y. Actin autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
7. Gleeson PA et al. Parietal Cell Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
8. Homberg JC, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. Hepatology 1987;7(6):1333-9.



AUTOANTIKÖRPER rKSL

Indirekte Immunfluoreszenz RATTEN LEBER/NIERE/MAGEN



AMENARINI
diagnostics

COD 50065 12 x 8 Bestimmungen

COD 50052 12 x 8 Bestimmungen

In-vitro-Diagnostikum für das klinische Labor

VERWENDUNGSZWECK

Reagenzien für die Bestimmung von multiplen Autoantikörpern in Humanserum. Die erhaltenen Ergebnisse sind als Hilfestellung bei der Diagnose und Überwachung von Autoimmunerkrankungen nützlich.

METHODENPRINZIP

Autoantikörper im Serum, die gegen den Kern (ANA), die Mitochondrien (AMA), glatte Muskulatur (ASMA), die Parietalzellen des Magens (APCA), Leber – Nieren Mikrosomen (LKM), Retikulin oder andere gerichtet sind, binden an die entsprechenden Antigene, die in Präparationen von Ratten-Leber, Niere oder Magen vorhanden sind. Die gebildeten Antigen-Antikörper Komplexe werden mittels Fluorescein markierten anti-human Immunglobulinen nachgewiesen und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops¹ sichtbar gemacht.

INHALT

		COD 50065	COD 50052
SLIDE	Objekträger	12 x 8 Best.	12 x 8 Best.
PBS	PBS (10x)	1 x 100 mL	-
CONTROL +	AMA Posit. Kontrolle	1 x 1 mL	-
CONTROL -	Negative Kontrolle	1 x 1 mL	-
CONJUGATE	IgG FITC/Evans	1 x 5 mL	-
MOUNT	Mounting Medium	1 x 5 mL	-
COVER SLD	Deckgläschen	1 x 12	-

ZUSAMMENSETZUNG

SLIDE Gewebeschnitte der Ratten- Leber, Magen, Niere.

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 Anti-Mitochondriale Antikörper enthält (AMA) 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 1%, Glycerol 87%, 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 Zellschicht wie Kratzer oder Ablösen der Zellschicht.

ZUSATZREAGENZIEN

PBS PBS (10x).

CONJUGATE IgG FITC/Evans.

MOUNT Eindeckmedium.

CONTROL+ ANA-Ho positive Kontrolle: Humanes Serum, das anti-nucleäre Antikörper (ANA) mit homogenem Muster enthält, sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL+ AMA Positive Kontrolle: Humanes Serum, das Anti-Mitochondriale Antikörper enthält (AMA) sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL+ ASMA Positive Control: Humanes Serum, das Anti-glatte Muskulatur Antikörper (ASMA) enthält, sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL+ LKM Positive Control: Humanes Serum, das Anti-Leber-Niere Mikrosomen Antikörper (LKM) enthält, sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL+ APCA Positive Control: Humanes Serum, das Anti-Parietalzellen Antikörper (LKM) enthält, sodium azide 0.95 g/L.

CONTROL- Negative Kontrolle.

REAGENZIVORBEREITUNG

PBS: Stellen Sie eine Verdünnung der PBS 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 Kammern
- 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 1/20 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 1/40 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 (50 μ L) auf ein Feld des Objektträgers 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).

- Den Objektträger in einer mit PBS gefüllten Wasch-Küvette 5 min waschen. Das PBS wechseln und das Waschen wiederholen.
- Den Objektträger mit Hilfe des mitgelieferten Blotting Papiers vorsichtig trocknen. Das Substrat darf nicht austrocknen
- Einen Tropfen von Conjugate auf jedes Feld auftragen. Den Objektträger dann für 30 min bei Raumtemperatur (15-30°C) in der Feuchtkammer inkubieren.
- Wiederum waschen (Punkt 6) und trocknen (Punkt 7).
- Einige Tropfen von Mounting Medium auf den Objektträger geben und mit einem Deckglas abdecken, dabei das Bilden von Luftblasen vermeiden.

AUSWERTUNG

Den Stoffabschnitt mit einem Fluoreszenzmikroskop (250-400x) untersuchen. Es empfiehlt sich, die Ablesung sofort vorzunehmen und dabei die Mitte und den Rand des Stoffes auszulassen.

Das Feststellen einer spezifischen fluoreszierenden Markierung wie nachfolgend beschrieben weist auf ein positives Ergebnis für die empfohlene Verdünnung hin.

ANA-homogen: Homogene und gleichmäßige Fluoreszenz über den gesamten Kern der Interphase Zellen. Starke Fluoreszenz der mitotischen Zellen.

AMA: Granuläre Fluoreszenz im Zytoplasma der Mitochondrien und der Nierentubuli.

ASMA: Färbung der Mukosa Muskularis, der Muskelschicht der Blutgefäße und der interglandulären kontraktilen Fibrillen des Ratten Magens.

APCA: Interzelluläre Färbung der Parietalzellen der Mukosa des Rattenmagens.

LKM: Typ I . Starke Fluoreszenz des Cytoplasmas der Hepatozyten in der Leber und in der proximalen Tubuli der Niere.

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 enthaltende 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 ist².

AMA: Mitochondriale Antikörper werden in über 95% der Patienten mit primärer biliärer Zirrhose und in weniger als 40% der Patienten mit Sklerodermie gefunden^{3,4}.

ASMA: Antikörper gegen glatte Muskulatur werden in Seren von 52-85% der Patienten mit autoimmuner chronischer Hepatitis und in 22% der Patienten mit primärer biliärer Zirrhose^{5,6} gefunden.

APCA: Antikörper gegen Parietalzellen werden in 90% der Patienten mit perniziöser Anämie, typischerweise in Assoziation mit anderen gewebespezifischen Autoimmunerkrankungen⁷ gefunden.

LKM: Anti- LKM Typ I Antikörper sind spezifische Marker der autoimmunen Hepatitis Typ II⁸.

Die klinische Diagnose sollte sich nicht nur auf das Ergebnis eines einzigen Tests stützen, sondern auch klinische und Labordaten mit 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. Melnicoff MJ. Immunofluorescence Methods for Microscopic Analysis. In: Howard GC ed. Methods in Nonradioactive Detection. Appleton & Lange, 1993.
2. Hollingsworth PN et al. Antinuclear antibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
3. Leung PSC et al. Mitochondrial Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
4. MacKay IR, and Gershwin ME. The autoantibodies of primary biliary cirrhosis: clinico pathological correlations. In: Van Venrooij WJ and Maini RN eds. Manual of Biological Markers of Diseases. Kluwer Academic Publishers, 1996.
5. Whittingham S and Mackay IR. Smooth muscle autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
6. Jacob G and Schoenfeld Y. Actin autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
7. Gleeson PA et al. Parietal Cell Autoantibodies. In: James B. Peter and Yehuda Schoenfeld eds. Autoantibodies. Elsevier, 1996.
8. Homberg JC, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. Hepatology 1987;7(6):1333-9.

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 SRL
DISTRIBUTORE: Via Sette Santi 3
DISTRIBUIDOR: 50131 Firenze
DISTRIBUTEUR: Tel. 0039-055-56801
ΔΙΑΝΟΜΕΑΣ: Fax 0039-055-5680-902
HÄNDLER: