



SISTEMA DI ANALISI DEGLI ANA-Ro COLORZYME® HEp-2000®

Per uso diagnostico in vitro
Per Uso Professionale

USO PREVISTO: analisi enzimatica indiretta degli anticorpi per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi antinucleari nel siero umano. Questo sistema di analisi usa cellule HEp-2 transfette[†], che consentono la specifica identificazione di anticorpi contro l'antigene SSA/Ro. Gli anticorpi contro l' SSA/Ro possono mostrare un disegno caratteristico nella colorazione delle cellule transfette. Quando è presente questo pattern, viene considerato come una prova che conferma la presenza di anticorpi anti-SSA/Ro.

L'assenza di questo pattern caratteristico non assicura la totale assenza di possibili anticorpi anti-SSA/Ro.

Questo sistema di analisi deve essere usato come ausilio nella determinazione di anticorpi associati alla malattia reumatica sistemica.

RIEPILOGO E INFORMAZIONI DI BASE

Anticorpo antinucleare (ANA) è un termine generico usato per descrivere gli anticorpi contro varie nucleoproteine cellulari. I primi studi su questi anticorpi, con l'uso di tecniche di immunofluorescenza, rivelarono alcune specificità proteiche nucleari selezionate (1). A causa dell'alta correlazione dell'ANA positivo con il lupus eritematoso sistemico (SLE), un ANA negativo fu principalmente escluso dalla patologia (2).

Sebbene anticorpi specifici del DNA continuino a dimostrare un'elevata correlazione della patologia con SLE (3), è stato anche scoperto un certo numero di macromolecole nucleari (4) e citoplasmatiche (5-7) associate ad altre patologie del tessuto connettivo (8-10). Alcuni di questi anticorpi sembrano avere un significato diagnostico e/o prognostico nella sclerosi sistemica progressiva (11-12), nella patologia mista del connettivo (13-15), nella sindrome di Sjögren (16-17), nella polimiosite (18) e/o nell'artrite reumatoide (19). A causa delle associazioni tra queste patologie, il test ANA è ora riconosciuto come uno strumento di screening generale per le malattie del tessuto connettivo (20).

La sensibilità del test ANA varia a seconda del tipo di substrato usato, delle procedure di fissaggio e dei tipi di ANA presenti nei sieri. I substrati della coltura cellulare in genere mostrano una maggiore sensibilità rispetto alle sezioni di tessuto (21-24). Il rilevamento di anticorpi all'antigene SSA/Ro è particolarmente variabile. I tessuti dei roditori non contengono livelli rilevabili di antigene SSA/Ro (25) e la rilevazione di anticorpi anti-SSA/Ro in substrati da coltura cellulare viene riportata con una variazione nella sensibilità dal 50% al 90% (26-27).

Il sistema di analisi ANA-Ro HEp-2000® Colorzyme® della Immuno Concepts con cellule epitelioidei umane mitotiche* transfette (HEp-2) rappresenta una tecnica avanzata di analisi immunoenzimatica per il rilevamento di ANA.

[†]Le cellule transfette e la loro applicazione sono protette dal brevetto statunitense 5,518,881

*Mitosi è un termine usato per descrivere il processo di suddivisione cellulare. Per lo più si suddivide in sei fasi, ovvero interfase, profase, metafase, anafase, telofase e citocinesi.

È stato dimostrato che, nel rilevamento di anticorpi nella sclerosi sistemica progressiva (PSS) (28), le cellule HEp-2 con figure mitotiche hanno una maggiore sensibilità e danno un pattern di riconoscimento più nitido rispetto al classico substrato di rene di topo. Le figure mitotiche agevolano il riconoscimento del pattern differenziale come pure il rilevamento di antigeni nucleari non riportati precedentemente, presenti in concentrazioni più elevate nelle cellule mitoticamente attive (29-31). Le cellule HEp-2 in questo sistema di analisi sono state transfette con copie multiple della specifica sequenza di DNA che trasporta le informazioni per l'autoantigene SSA/Ro. Circa il 10-20% delle cellule transfette sovrapproduce questo antigene, quindi il rilevamento di anticorpi diretti contro l' SSA/Ro è più coerente di quanto lo sia su cellule HEp-2 che non siano state transfette. Gli anticorpi contro l' SSA/Ro possono mostrare un disegno caratteristico nella colorazione delle cellule transfette. Quando è presente questo pattern, viene considerato come una prova che conferma la presenza di anticorpi anti-SSA/Ro.

L'assenza di questo pattern caratteristico non assicura la totale assenza di possibili anticorpi anti-SSA/Ro.

PRINCIPIO DEL TEST

Il sistema di analisi degli ANA-Ro HEp-2000[®] Colorzyme[®] della Immuno Concepts utilizza una tecnica di analisi enzimatica indiretta degli anticorpi. I campioni diluiti del paziente sono incubati con substrato antigene per consentire lo specifico legame degli autoanticorpi ai nuclei delle cellule. Se gli ANA sono presenti, si forma un complesso stabile antigene-anticorpo. Dopo il lavaggio per rimuovere anticorpi non specificamente legati, il substrato è incubato con un anticorpo anti-umano coniugato con HRP (Horseradish peroxidase, perossidasi di rafano). Quando i risultati sono positivi, avviene la formazione di un complesso stabile in tre parti composto dall'anticorpo anti-umano coniugato con HRP legato all'anticorpo antinucleare umano che è legato all'antigene nucleare. Questo complesso viene visualizzato incubando il vetrino in reagente colorato contenente uno specifico substrato enzimatico. La reazione tra l'anticorpo etichettato come enzimatico e il substrato specifico dell'enzima origina una reazione colorata, visibile mediante normale microscopia ottica sul vetrino. Nei campioni positivi, i nuclei delle cellule mostreranno una fluorescenza blu-viola con un pattern di colorazione caratteristico della particolare distribuzione dell'antigene nucleare nelle cellule. Se il campione è negativo per l'ANA, il nucleo non mostrerà un pattern di colorazione nucleare chiaramente distinguibile. Il citoplasma può mostrare una debole colorazione mentre la regione non cromosomica delle cellule mitotiche può mostrare una colorazione più intensa.

COMPONENTI DEL SISTEMA - MATERIALI FORNITI

Uso: tutti i componenti sono pronti per l'uso senza che siano necessarie la suddivisione in aliquote o la ricostituzione (eccetto il tampone PBS e il reagente colorato Colorzyme[®] che devono essere sciolti in acqua deionizzata o distillata prima dell'uso).

Conservazione: tutti i componenti possono essere conservati alla temperatura di 2-10°C. Dopo la ricostituzione, il tampone PBS deve essere conservato in contenitori con tappo a vite e conservato tra i 2-25°C.

Dopo la ricostituzione, il reagente colorato Colorzyme[®] deve essere conservato in un contenitore chiuso a temperatura ambiente per un massimo di 30 giorni. A seconda della frequenza d'uso, è possibile utilizzare fino a venti vetrini con 150 ml di reagente colorato Colorzyme[®].

Stabilità: tutti i componenti restano stabili per almeno 12 mesi dalla data di produzione. Non usare alcun componente oltre la data di scadenza.

REAGENTI REATTIVI

Vetrini del substrato [SLIDE]: Vetrini per substrato ANA che usano cellule HEp-2000[®] (con figure mitotiche) coltivate e stabilizzate direttamente sui pozzetti per analisi. Queste sono cellule HEp-2 che sono state stabilmente transfette con l'autoantigene SSA/Ro. L'esclusivo design a fossa del vetrino minimizza la contaminazione incrociata dei pozzetti durante l'analisi. La busta del vetrino viene riempita con un gas inerte non tossico che favorisce la stabilità delle cellule.

Controllo positivo SSA/Ro [CONTROL] +: numero di catalogo 2035-Ro. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpo specifico per antigeni SSA/Ro. Questo siero mostra la reazione con colorazione a chiazze sottili che è tipica dell'anti-SSA/Ro visto sul substrato cellulare HEp-2000[®] della Immuno Concepts. La produzione si trova in modo predominante nel nucleo con colorazione nucleolare prominente. Nelle cellule sovrapproduttrici può anche essere vista una debole colorazione citoplasmatica. La regione cromosomica delle cellule mitotiche mostra una reazione a colorazione negativa.

Controllo positivo omogeneo [CONTROL|+]: numero di catalogo 2021. Fiala contagocce pronta all'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpo specifico per il DNA e/o antigeni nucleari DNP. Questo siero dimostra una reazione a colorazione omogenea sul substrato cellulare HEp-2000® della Immuno Concepts. La regione cromosomica delle cellule mitotiche mostra la stessa reazione alla colorazione omogenea.

Controllo positivo a chiazze [CONTROL|+]: numero di catalogo 2022. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpo specifico per antigeni nucleari Sm e/o RNP. Questo siero mostra una delle reazioni con colorazione a chiazze più comunemente viste sul substrato cellulare HEp-2000® della Immuno Concepts. La regione cromosomica delle cellule mitotiche mostra una reazione a colorazione negativa.

Controllo positivo nucleolare [CONTROL|+]: numero di catalogo 2023. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpo specifico per antigeni nucleolari. Questo siero dimostra una reazione con colorazione nucleolare sul substrato cellulare HEp-2000® della Immuno Concepts.

Controllo positivo centromere [CONTROL|+]: numero di catalogo 2025. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpo specifico per centromeri cromosomici (cinetocore). Questo siero dimostra una discreta reazione con colorazione a chiazze sul substrato cellulare HEp-2000® della Immuno Concepts. La regione cromosomica delle cellule mitotiche mostra la stessa discreta reazione con colorazione a chiazze.

Siero di controllo titolabile [TC]: numero di catalogo 2026. Fiala pronta per l'uso contenente 0,5 ml di siero di controllo umano positivo da trattare come campione del paziente, non diluito.

Siero di controllo negative [CONTROL|-]: numero di catalogo 2031. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano negativo. Sebbene il siero di controllo negativo possa dimostrare una leggera colorazione del citoplasma con colorazione più brillante della regione non cromosomica della cellula mitotica, esso dimostra un pattern non distinguibile di colorazione nucleare.

Reagente anticorpo enzimatico [CONJ|HRP]: numero di catalogo 4009-Ro (9,0 ml), 4075-Ro (23 ml). Anti-IgG umane coniugata con HRP. Il reagente è pronto all'uso e si presenta in flaconi contagocce di precisione con 9,0 ml per ogni 10 vetrini in kit di analisi completi.

Reagente colorato [PWDR|CRP]: numero di catalogo 4066. Polvere di substrato enzimatico specifico dell'HRP, contenente 4-cloro-1-naftolo. Ogni confezione contiene polvere per preparare 150 ml di reagente colorato Colorzyme® autoattivante.

Preparazione: sciogliere il contenuto di una busta in un litro di acqua deionizzata o distillata. Mescolare bene fino al completo dissolvimento. Questo reagente colorato è stabile per 30 giorni a temperatura ambiente in un contenitore chiuso. Questo reagente colorato può essere riutilizzato fino a 30 giorni o fino a che non è visibile un cambiamento di colore o un precipitato. Torbidezza o opalescenza, senza alcun precipitato visibile al momento del riutilizzo, sono normali. A seconda della frequenza d'uso, è possibile utilizzare fino a venti vetrini con 150 ml di reagente colorato Colorzyme®.

COMPONENTI NON REATTIVI

Tampone impregnato di polvere PBS [PWDR|PBS]: numero di catalogo 1011. Polvere salina tamponata al fosfato (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Ciascuna busta contiene polvere tamponata sufficiente a fare 1 litro. (Nei kit di analisi completi, viene fornita una busta di polvere tamponata per cinque vetrini).

Preparazione: sciogliere una bustina di polvere tamponata in un (1) litro di acqua deionizzata o distillata, coprire, e conservati tra i 2-25°C per massimo quattro settimane o fino a che compaiano segni di contaminazione o altri cambiamenti visibili.

Mezzo di fissaggio semipermanente [SOLN|MM]: numero di catalogo 1111. Fiala contagocce pronta per l'uso contenente 5,0 ml di mezzo di fissaggio a base di glicerolo.

Vetrini coprioggetto [CVSLP]: numero di catalogo 1042. Ciascuna confezione contiene dieci vetrini coprioggetto 24 x 64 mm N. 1.

ALTRI MATERIALI NECESSARI - MA NON FORNITI

Pipette volumetriche per l'erogazione di volumi da 20-25 µl
Vaschette Coplin o capsule di colorazione
Flacone morbido o pipette di Pasteur
Pipette sierologiche
Contenitori con tappo a vite da un litro (per tampone PBS)
Contenitori chiusi per la conservazione del reagente colorato Colorzyme®
Acqua deionizzata o distillata
Provette per preparare le diluizioni dei sieri
Camera per incubazione
Carta bibula o assorbente
Guanti a perdere
Timer da laboratorio
Microscopio luminoso capace di ingrandimenti da 200X e 400X

PRECAUZIONI

1. Tutti i materiali di origine umana usati per questo prodotto sono stati analizzati e trovati negativi (non ripetutamente reattivi) per gli anticorpi del virus dell'immunodeficienza umana tipo 1 (HIV-1), del virus della immunodeficienza umana tipo 2 (HIV-2), del virus dell'epatite C (HCV) e per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) con metodi approvati dalla FDA. Nessun metodo di analisi può garantire con completa sicurezza che siano assenti HIV-1, HIV-2, epatite C, epatite B o altri agenti infettivi. Quindi, tutti i componenti del kit vanno maneggiati secondo le stesse modalità utilizzate per i materiali potenzialmente infettivi.
2. Tutti i campioni dei pazienti devono essere maneggiati osservando le precauzioni di sicurezza biologica di livello 2, come raccomandato per ogni siero umano potenzialmente infettivo o per campioni di sangue nel manuale pubblicato per i CDC/NIHM (Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual, Centri per il Controllo delle Infezioni/Istituti Nazionali per la Sanità): *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. La diluizione di componenti o la sostituzione di componenti diversi da quelli forniti in questo sistema può dare risultati non coerenti.
4. Il sodio azide (0,09%) viene usato come conservante. Il sodio azide può reagire nelle tubature di piombo o rame formando sali metallici di azide esplosivi. Quando si eliminano i reagenti, far scorrere grandi quantità di acqua del rubinetto per evitare la formazione di potenziali residui nelle tubature. Il sodio azide è un veleno e può essere tossico se ingerito.
5. Questo kit è per uso diagnostico *in vitro*.
6. Nel caso debbano essere usati sieri emolizzati o lipemici, per risultati ottimali, inattivare a caldo i sieri per 30 minuti a 56°C. Non usare sieri contaminati microbicamente.
7. Il siero di controllo titolabile è destinato ad essere usato nel monitoraggio da lotto a lotto e nella riproducibilità interfase. Non è destinato alla misurazione della sensibilità complessiva o della specificità del dosaggio.
8. Non fumare, non mangiare o non bere nelle aree in cui sono maneggiati i campioni o i reagenti del kit.
9. Evitare sempre gli spruzzi e la formazione di aerosol.
10. Tempi e temperature di incubazione diversi da quelli specificati possono dare risultati errati.
11. La contaminazione incrociata dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi.
12. Prima dell'uso, la vetreria di laboratorio riutilizzabile deve essere lavata e sciacquata a fondo e completamente liberata da ogni residuo di detergente. Prima dell'uso, tutta la vetreria di laboratorio deve essere pulita e asciutta.
13. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti, i vetrini e i campioni a temperatura ambiente (18-25°C).
14. Indossare guanti a perdere quando si maneggiano campioni e reagenti e dopo lavare accuratamente le mani.
15. La contaminazione microbica dei reagenti o dei campioni può dare origine a risultati falsi.
16. Non pipettare mai con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni con la cute e le mucose. In caso di contatto, lavare abbondantemente con un sapone germicida e acqua.
17. Il reagente colorato può essere riutilizzato fino a 30 giorni o fino a che non è visibile un cambiamento di colore o un precipitato. Torbidezza o opalescenza, senza alcun precipitato visibile al momento del riutilizzo, sono normali. A seconda della frequenza d'uso, è possibile utilizzare fino a venti vetrini con 150 ml di reagente colorato Colorzyme®.

RACCOLTA DI CAMPIONI

Raccolta: il siero è il campione preferito. Devono essere prelevati con tecnica asettica circa 5 ml di sangue intero per venopuntura usando una provetta di raccolta sterile a vuoto o un altro sistema di raccolta adatto. Lasciare che il sangue si coaguli a temperatura ambiente (18-25°C). Non appena possibile, il siero deve essere separato dal coagulo per centrifugazione in modo da minimizzare l'emolisi.

Sostanze interferenti: non vanno usati sieri che mostrano un alto grado di emolisi, ittero, lipemia o crescita microbica, perché queste condizioni possono provocare risultati atipici. Campioni contenenti sostanze particellari visibili vanno chiariti per centrifugazione prima dell'analisi.

Conservazione: i sieri possono essere conservati a 2-10°C fino ad una settimana. Se l'analisi viene ulteriormente rimandata, i sieri devono essere conservati congelati a -20°C o a una temperatura inferiore. Il siero non deve essere conservato in frigoriferi autosbrinanti o in freezer.

ATTENZIONE: il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni dei pazienti può dare origine a falsi risultati positivi o a falsi risultati negativi.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

CONTROLLO DELLA QUALITÀ

I controlli positivo, negativo e del PBS devono essere eseguiti una sola volta per ogni prova. Il controllo positivo dovrebbe mostrare una colorazione luminosa blu scuro-viola nei nuclei delle cellule, con un pattern chiaramente distinguibile, caratteristico del siero di controllo usato. Nel pozzetto di controllo positivo il citoplasma può colorarsi di blu chiaro-viola. Il controllo negativo dovrebbe mostrare una colorazione blu chiaro-viola sia del citoplasma che del nucleo, ma senza alcun pattern distinguibile della colorazione nucleare. Il controllo PBS si usa per osservare la colorazione non specifica del reagente anticorpo enzimatico, e non dovrebbe mostrare alcuna colorazione blu. Se i controlli non appaiono come descritto, il test non è valido e deve essere ripetuto. Se si deve usare l'analisi ANA-Ro HEp-2000® per confermare la presenza di anticorpi anti-SSA/Ro, il controllo positivo SSA/Ro, numero di catalogo 2035-Ro, deve essere eseguito su almeno un vetrino nella sessione di lavoro di quel giorno.

CONTROLLO TITOLABILE OPZIONALE

Nel leggere i titoli, molti laboratori iniziano a leggere dal pozzetto contenente il campione più diluito e leggono "all'indietro" fino alla diluizione 1:40. Il primo pozzetto in cui è visibile un pattern di colorazione nucleare chiaramente distinguibile è il punto di equivalenza della reazione. Raccomandiamo questa tecnica per determinare i punti di equivalenza della reazione.

Il titolo medio e la gamma del titolo (\pm una diluizione su ciascun lato della media) determinati sono stati stabiliti nel nostro laboratorio e sono indicati come guida. Questo controllo è fornito per consentire a ciascun laboratorio di valutare la riproducibilità (di precisione) del proprio test ANA. Dal momento che questo controllo non è destinato ad essere un indicatore dell'accuratezza del titolo, ciascun laboratorio deve stabilire il proprio punto medio di equivalenza della reazione per questo campione e deve usare tali informazioni per valutare la riproducibilità interfase (di precisione).

Attraverso analisi multiple di questo controllo titolabile, usando il sistema di analisi degli ANA-Ro HEp-2000® Colorzyme® della Immuno Concepts, è stato stabilito un valore medio del titolo per ciascun numero di lotto. Il numero di lotto, il titolo medio e la gamma del titolo (\pm una duplice diluizione su ciascun lato della media) sono indicati sull'etichetta della fiala e vanno usati come guida della performance del sistema di analisi.

È importante che l'intensità della colorazione non venga confusa con la presenza o l'assenza di anticorpi antinucleari. Il fattore chiave da considerare nel determinare se una data diluizione del siero è positiva è l'aspetto del pattern chiaramente distinguibile, senza tener conto dell'intensità della colorazione. Questo controllo titolabile mostrerà il tipico pattern a chiazze associato all'anticorpo RNP. Può essere presente, però, anche un secondo pattern di NSp I (parecchie chiazze discrete nel nucleo delle cellule interfase), che comunque è il tipico pattern a chiazze RNP da usare per leggere il punto di equivalenza della reazione.

I valori ottenuti nel nostro laboratorio possono essere diversi dai vostri. Di seguito sono indicati alcuni tra i fattori che possono influenzare i risultati.

1. Il giusto allineamento del percorso ottico del microscopio. Per istruzioni, consultare il manuale del proprio microscopio.

2. L'apertura numerica dell'obiettivo. L'apertura numerica è correlata alla capacità di captazione della luce ed alla risoluzione dell'obiettivo. L'apertura numerica è stampata sul lato dell'obiettivo.
3. La precisione e l'accuratezza della tecnica di diluizione, dell'apparecchiatura e della performance delle procedure di analisi.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL PAZIENTE

Per screening positivo/negativo si raccomanda un ingrandimento di 200X totali, mentre per il riconoscimento del pattern e per visualizzare le cellule mitotiche si raccomanda un ingrandimento di 400X totali.

Negativo: un siero si considera negativo per gli anticorpi antinucleari se la colorazione nucleare è minore o uguale al pozzetto di controllo negativo con nessun pattern chiaramente distinguibile. Il citoplasma può mostrare una debole colorazione con colorazione più brillante della regione non cromosomica delle cellule mitotiche, ma senza alcun pattern nucleare chiaramente distinguibile.

Positivo: un siero si considera positivo se il nucleo mostra un pattern di colorazione chiaramente distinguibile nella maggior parte delle cellule interfase.

SSA/Ro: un siero si considera positivo per gli anticorpi SSA/Ro se il 10-20% dei nuclei interfase mostra il caratteristico pattern di colorazione SSA/Ro che appare come caratteristico a chiazze con un pattern di colorazione prominente dei nucleoli. Queste sono le cellule transfette sovrapproduttrici. Il restante 80-90% dei nuclei interfase può mostrare o meno una colorazione a chiazze sottili del nucleo con o senza colorazione dei nucleoli.

Titoli: nel leggere i titoli, molti laboratori iniziano a leggere dal pozzetto contenente il campione più diluito e leggono "all'indietro" fino alla diluizione 1:40. Il primo pozzetto in cui è visibile un pattern chiaramente distinguibile è il punto di equivalenza della reazione. Raccomandiamo questa tecnica per determinare i punti di equivalenza della reazione. È importante che l'intensità della colorazione non venga confusa con la presenza o l'assenza di anticorpi antinucleari. Il fattore chiave da considerare nel determinare se una data diluizione del siero è positiva è l'aspetto del pattern chiaramente distinguibile, indipendentemente dall'intensità della colorazione. A causa della accresciuta concentrazione di antigene SSA/Ro nelle cellule sovrapproduttrici, non è insolito vedere la colorazione di queste cellule in titoli molto alti. Il significato clinico di questi titoli alti è sconosciuto.

ATTENZIONE: alcuni sieri possono mostrare una colorazione nucleare e citoplasmatica senza alcun pattern nucleare apparente. Questo fenomeno in genere è dovuto agli anticorpi eterofili e deve essere riportato come negativo (32).

INTENSITÀ DELLA COLORAZIONE ENZIMATICA

Il grado di intensità della colorazione non ha valore clinico dimostrato e il suo valore si limita ad essere indicatore del titolo (33). Per semplificare l'interpretazione, registrare i risultati dello screening come fortemente positivi o positivi, e titolare di conseguenza.

Reazione fortemente positiva: colorazione blu-viola da scura a molto scura, profilo cellulare netto, pattern nucleare ben definito.

Reazione positiva: colorazione blu sbiadita o smorzata con maggiore variabilità di colorazione tra le cellule; il profilo cellulare può essere meno definito in alcune cellule con una maggioranza di cellule che ancora mostrano un pattern della colorazione chiaramente distinguibile.

NOTA: poiché le cellule sono coltivate direttamente sulla superficie del vetrino, non tutte sono nella stessa fase del ciclo cellulare. Non è insolito vedere diverse intensità di colorazione tra le cellule dovute alle differenze nella concentrazione e nella posizione di diversi antigeni durante il ciclo cellulare.

RIPORTO DEI RISULTATI

Screening: i risultati vanno riportati come fortemente positivi o positivi alla diluizione 1:40 e va riportato il pattern della colorazione nucleare.

Titoli: i risultati vanno riportati come ultima diluizione del siero in cui si vede un pattern chiaramente distinguibile. Risultati con elevata reattività alla più alta diluizione dovrebbero essere riportati come superiori a quella diluizione. Titoli da 1:40 a 1:80 sono considerati bassi; da 1:160 a 1:320 sono considerati medi e da 1:640 e maggiori sono

considerati alti. Non è necessario determinare il titolo endpoint. Qualsiasi titolo ANA superiore o uguale a 1:640 è considerato un titolo elevato, e avverte il clinico sulla necessità di eseguire ulteriori analisi. Ogni laboratorio deve stabilire il proprio schema di titolazioni, sulla base degli anticorpi rilevati nella popolazione dei pazienti.

RILEVAMENTO DEL PATTERN

Omogeneo: una colorazione del nucleo uniforme, con o senza mascheramento apparente dei nucleoli. La regione cromosomica delle cellule mitotiche metafase è chiaramente positiva con una intensità di colorazione liscia o periferica maggiore o uguale ai nuclei interfase.

Sinonimi: diffuso; uniforme.

Antigeni nucleari: dsDNA; nDNA; DNP; istone.

Associazione con patologie: titoli alti suggeriscono SLE (Systemic Lupus Erythematosus, lupus eritematoso sistemico). Titoli bassi suggeriscono SLE o altre patologie del tessuto connettivo (34).

Periferico: una colorazione uniforme, principalmente intorno alle regione esterna del nucleo con colorazione più debole verso il centro del nucleo. La regione cromosomica delle cellule mitotiche metafase è chiaramente positiva con una intensità di colorazione liscia o periferica maggiore o uguale ai nuclei interfase.

Sinonimi: bordato, scabro, membranoso.

Antigeni nucleari: dsDNA, ssDNA, nDNA; DNP; istone.

Associazione con patologie: titoli bassi suggeriscono SLE; titoli bassi suggeriscono SLE o altre patologie del tessuto connettivo (34).

A chiazze: una colorazione grossolana o finemente granulata del nucleo in genere senza colorazione fluorescente dei nucleoli. La regione non cromosomica delle cellule mitotiche metafase mostra colorazione, mentre la regione cromosomica è negativa alla colorazione.

Antigeni nucleari: Sm; RNP; Scl-70; SSA/Ro; SSB/La; e altri sistemi antigene/anticorpo non ancora caratterizzati.

Associazione con patologie: titoli alti suggeriscono SLE (antigene Sm), malattia mista del tessuto connettivo (antigene RNP), sclerodermia (antigene Scl-70) o complesso sindrome di Sjögren-sicca (antigene SSA/Ro o SSB/La). Titoli bassi possono suggerire SLE o altre patologie del tessuto connettivo (35).

Nucleolare: grande colorazione a chiazze grossolana all'interno del nucleo, in genere meno di 6 per cellula, con o senza chiazze sottili occasionali in numero di 5-10. La regione non cromosomica delle cellule mitotiche metafase mostra una forte colorazione, mentre la regione cromosomica può mostrare una colorazione tenue. Cellule anafase e telofase possono mostrare una colorazione simile ai nuclei interfase.

Antigeni nucleari: in genere chiamati 4-6s RNA e altri antigeni nucleari come fibrillarina, RNA polimerasi I, NOR 90 e PM/Scl.

Associazione con patologie: titoli alti prevalenti nella sclerodermia e nella sindrome di Sjögren (36).

Centromero: un pattern a chiazze discreto fortemente indicativo della sindrome CREST[§] variante della sclerosi sistemica progressiva (25). Le chiazze nucleari sono molto discrete e in genere in qualche modo multiple di 46 (in genere 23-46 chiazze per nucleo). Poiché i centromeri sono restringimenti in cui le fibre del fuso si fissano ai cromosomi, le cellule mitotiche mostreranno la stessa reazione a chiazze nella regione cromosomica (12).

Sinonimi: ACA; a chiazze discrete.

Antigeni nucleari: centromero cromosomico (cinetocoro).

Associazione con patologie: fortemente indicativo della sindrome CREST variante della sclerosi sistemica progressiva (28).

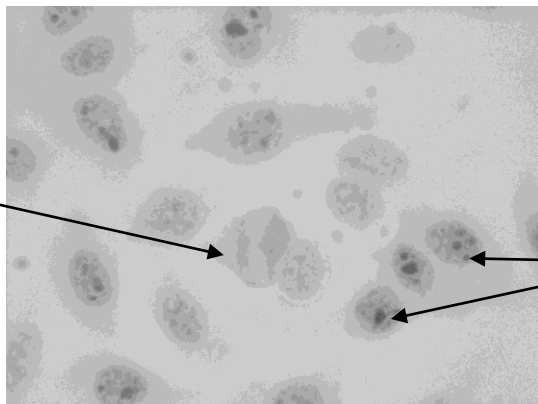
SSA/Ro: caratteristico pattern a chiazze con colorazione prominente dei nucleoli nel 10-20% dei nuclei interfase. Queste sono le cellule transfette sovrapproduttrici. Il restante 80-90% dei nuclei interfase può mostrare o meno una colorazione a chiazze sottili del nucleo con o senza colorazione dei nucleoli. La regione non cromosomica delle cellule mitotiche metafase mostra colorazione, mentre la regione cromosomica è negativa.

Antigeni nucleari: SSA/Ro (60kD).

Associazione con patologie: rilevata nel 60-70% dei pazienti con sindrome di Sjögren primaria, nel 30-40% di pazienti con SLE e in più del 95% di pazienti con lupus cutaneo sub-acuto (37).

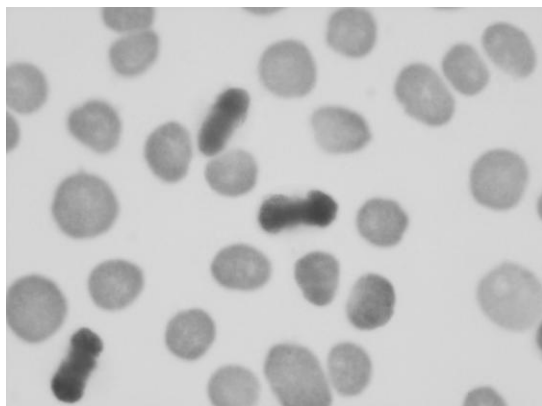
[§]CREST è una forma di PSS con calcinosi prominente, fenomeno di Raynaud, disfunzione esofagea, sclerodattilia e teleangectasia.

Cellula Mitotica

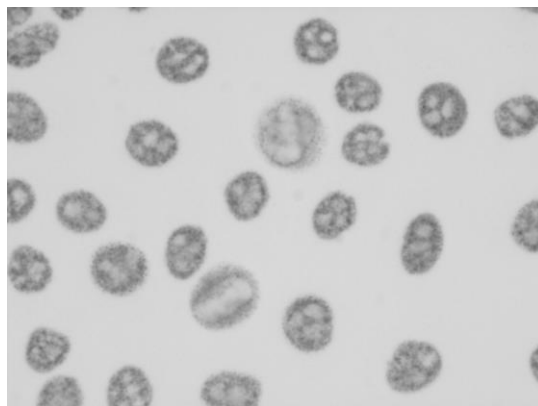


Cellula Sovraespressa

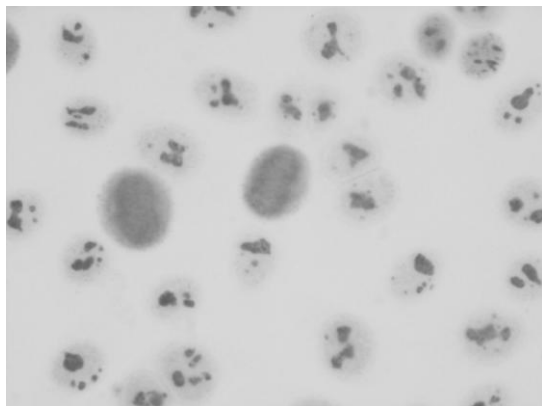
PATTERN BASILIARA DELLA COLORAZIONE



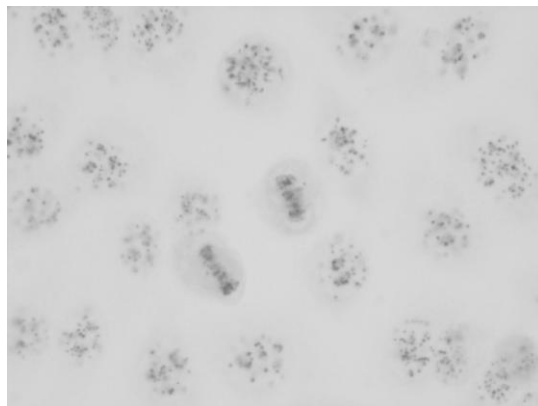
Omogeneo



Punteggiato



Nucleolare



Centromero

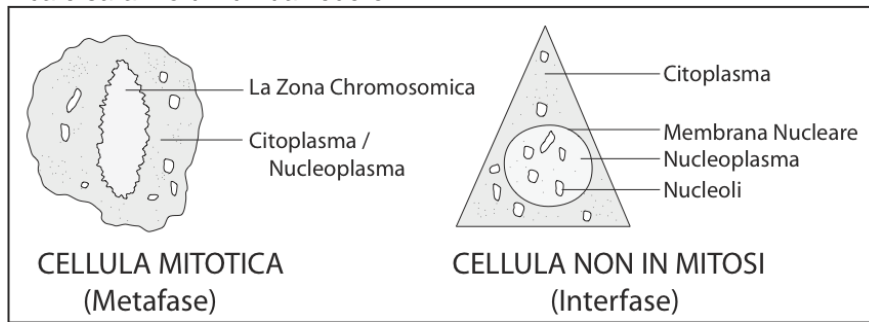
CELLULE MITOTICHE

RILEVAMENTO

Le cellule mitotiche dovrebbero essere visibili su ogni campo se visualizzate con ingrandimento 200X o inferiore. Per verificare se una cellula è in mitosi, visualizzare con ingrandimento 400X. Le cellule mitotiche mostrano una caratteristica forma cellulare rotonda senza alcuna membrana nucleare rilevabile. La regione cromosomica delle cellule mitotiche in genere mostra una forma irregolare all'interno della cellula dovuta alla mancanza di membrana nucleare ed un estremo restringimento dei cromosomi.

Sieri positivi per DNA e/o DNP e/o istone (come il controllo positivo omogeneo della Immuno Concepts) mostreranno una colorazione brillante della regione cromosomica di queste cellule. In campioni negativi per DNA e/o DNP e/o

istone (come il controllo positivo a chiazze della Immuno Concepts), le cellule mitotiche non mostreranno una colorazione cromosomica e saranno difficili da vedere.



USO DELLA CELLULE MITOTICHE

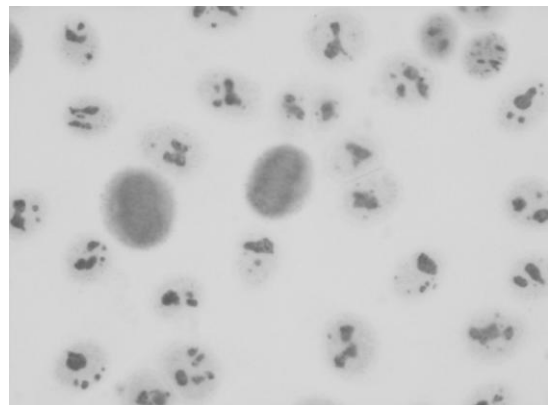
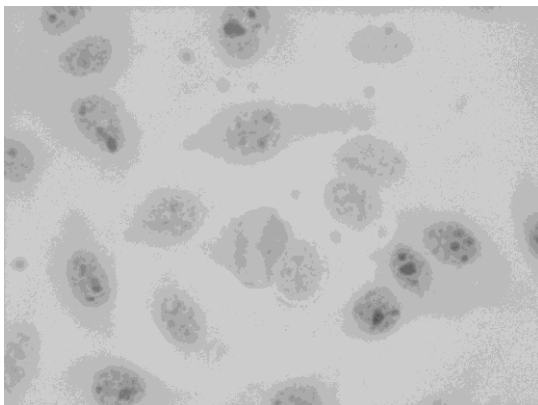
Distinzione tra anticorpi a chiazze ed omogenei: il pattern di colorazione a chiazze sottili è talvolta difficile da differenziare da una colorazione omogenea. Se il pattern è omogeneo, avverrà una colorazione uniforme dei cromosomi delle cellule mitotiche. Se il pattern è proprio a chiazze, la regione fuori dai cromosomi mostrerà una sottile reazione a chiazze.

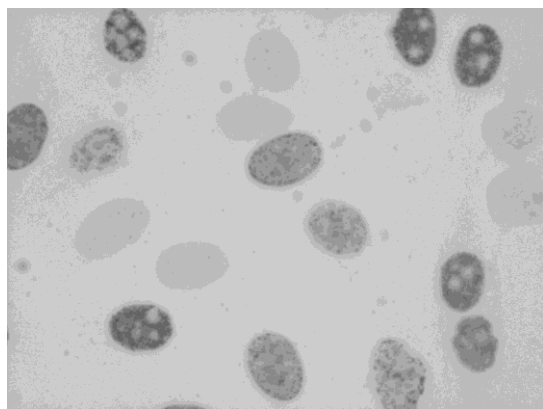
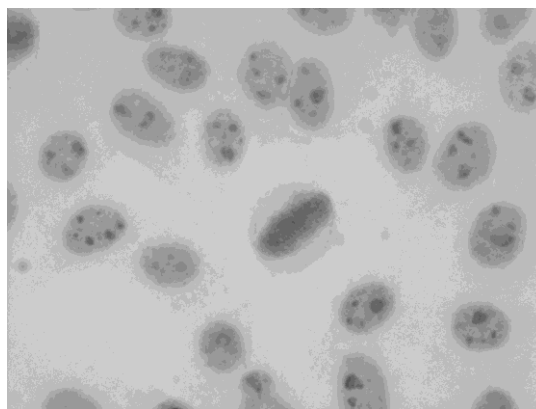
NOTA: se si presenta una chiazzeria sottile dell'intera cellula mitotica con colorazione uniforme della regione cromosomica, è molto probabile che siano presenti due o più anticorpi. Riportare la diluizione dello screening come a chiazze/omogenea e titolare ciascun anticorpo al punto di equivalenza.

Anticorpo della membrana periferica contro anticorpo della membrana nucleare: un anticorpo che mostra un pattern periferico che in genere si associa con antigeni nucleari DNA/DNP. Titoli alti di questi anticorpi suggeriscono SLE. In substrati che non comprendono cellule mitotiche, il pattern periferico può essere difficile da distinguere dall'anticorpo della membrana nucleare. Usando le cellule mitotiche della Immuno Concepts, questi pattern possono essere differenziati, perché la regione cromosomica delle cellule mitotiche verrà colorata intensamente in un pattern periferico senza però essere colorata dall'anticorpo della membrana nucleare. Questa distinzione è clinicamente importante perché l'anticorpo della membrana nucleare non ha specificità DNA/DNP e non è associata all'SLE (38).

Anticorpo Anti-Centromero (ACA) contro anticorpo atipico a chiazze somigliante al centromero: per verificare l'anticorpo anti-centromero la regione cromosomica delle cellule mitotiche dovrebbe avere un colore brillante con chiazze discrete. Se la regione cromosomica non si colora, l'anticorpo non è anti-centromero e va riportato come "a chiazze atipico" (39).

SSA/Ro contro pattern che possono somigliare alla colorazione SSA/Ro: la caratteristica colorazione SSA/Ro è vista come un pattern brillante a chiazze con colorazione prominente dei nucleoli nel 10-20% dei nuclei interfase. Il restante 80-90% dei nuclei interfase può mostrare o meno una colorazione a chiazze sottili del nucleo con o senza colorazione dei nucleoli. La regione cromosomica delle cellule mitotiche metafase non mostra colorazione. Il pattern nucleolare può essere differenziato dalla grande colorazione a chiazze grossolane in tutti i nuclei, in genere meno di 6 per cellula. Il disegno Scl-70 mostra una sottile colorazione a chiazze e colorazione nucleolare in tutti i nuclei interfase della regione cromosomica delle cellule mitotiche metafase. Gli anticorpi contro l'antigene PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen, Antigene nucleare delle cellule aggressive) mostrano una chiazzeria variabile grossolana e sottile nel 30-50% dei nuclei interfase.



SSA/Ro**PCNA****Nucleolare****Scl-70**

COLORAZIONE CITOPLASMICA

Sebbene gli anticorpi degli antigeni citoplasmatici non siano comunemente associati a patologie del tessuto connettivo, questi anticorpi possono essere rilevati usando substrati di coltura di cellule epiteliali (40). Gli anticorpi mitocondriali e del muscolo liscio sono i due anticorpi rilevati più di frequente e sono in genere associati a mononucleosi, epatite cronica attiva e patologie al fegato (41, 42). Usando il substrato cellulare HEP-2, è stato anche dimostrato l'anticorpo del muscolo liscio in pazienti con verruche (43).

Anticorpo anti-mitondriale (AMA): chiazze discrete concentrate nella regione perinucleare della cellula ed estese in bassa densità nelle regioni esterne del citoplasma. Vanno distinte dall'anticorpo anti-Golgi, che in genere colora solo un lato della regione perinucleare e dall'anticorpo anti-ribosomico che mostra chiazze più sottili con un aspetto filiforme in linea con la posizione del reticolo endoplasmatico all'interno della cellula.

NOTA: le chiazze perinucleari possono essere molto facilmente distinguibili dalla colorazione nucleare periferica notando che le chiazze mitocondriali formano una colorazione a chiazze ininterrotta intorno alla parte esterna della membrana nucleare mentre i sieri periferici formano una colorazione uniforme e liscia all'interno della membrana nucleare.

RIPORTARE I SIERI COME NEGATIVI PER GLI ANTICORPI ANTINUCLEARI E VERIFICARE I POSITIVI PER L'ANTICORPO ANTIMITOCONDRIALE SU SPECIFICO SUBSTRATO AMA.

Anticorpo anti-muscolo liscio (ASMA): colorazione fibrosa molto sottile sull'intero citoplasma delle cellule con aspetto a "tela di ragno". A differenza dell'anticorpo mitocondriale, la colorazione dell'anticorpo del muscolo liscio è uniforme in tutto il citoplasma e può anche estendersi al di sopra del nucleo. Le cellule mitotiche in genere mostrano grandi chiazze discrete al di fuori della regione cromosomica. È stato dimostrato che l'anticorpo del muscolo liscio ha un'alta specificità dell'actina (44-45).

RIPORTARE I SIERI COME NEGATIVI PER GLI ANTICORPI ANTINUCLEARI E VERIFICARE I POSITIVI PER L'ANTICORPO ANTI-MUSCOLO LISCIO SU SPECIFICO SUBSTRATO ASMA.

LIMITI DEL TEST

1. Le diagnosi non possono essere fatte solo sulla base del rilevamento dell'anticorpo antinucleare. Il medico deve interpretare questi risultati confrontandoli con l'anamnesi e i sintomi del paziente, i dati fisici e altre procedure diagnostiche.
2. La cura non va iniziata sulla sola base di un test positivo per gli anticorpi antinucleari. Prima di iniziare qualunque trattamento devono essere considerate indicazioni cliniche, altri risultati di laboratorio e l'impressione clinica del medico.
3. Certi farmaci, tra cui la procainamide e la idralazina, possono indurre una patologia del tipo lupus eritematoso (46). Pazienti con lupus eritematoso indotto da farmaci possono mostrare ANA positivi omogenei o omogenei/periferici comunemente diretti contro gli istoni nucleari (47).

4. Una piccola percentuale di pazienti con SLE può non dimostrare degli ANA per mezzo di immunoenzima indiretto anche se può mostrare ANA mediante altre tecniche (48).
5. Non è necessario determinare il titolo endpoint. Qualsiasi titolo ANA superiore o uguale a 1:640 è considerato un titolo elevato, e avverte il clinico sulla necessità di eseguire ulteriori analisi. Ogni laboratorio deve stabilire il proprio schema di titolazioni, sulla base degli anticorpi rilevati nella popolazione dei pazienti. Sebbene un ANA con titolo alto possa essere fortemente indicativo di una malattia del tessuto connettivo, ciò non deve essere considerato come diagnostico ma esaminato piuttosto come parte della complessiva storia clinica del paziente.
6. I pattern della colorazione spesso cambiano con la progressiva titolazione dei sieri. Generalmente, questo fenomeno è dovuto alla presenza di più di un anticorpo nucleare.
7. Gli ANA positivi sono osservabili anche in una piccola percentuale di pazienti con malattie infettive e/o neoplastiche (9).
8. Gli anticorpi contro l' SSA/Ro possono mostrare un pattern caratteristico nella colorazione delle cellule transfette HEp-2000[®]. Quando è presente questo pattern, viene considerato come una prova che conferma la presenza di anticorpi anti-SSA/Ro. L'assenza di questo particolare pattern non esclude l'eventuale presenza di anticorpi anti-SSA/Ro.
9. A causa della sovrapproduzione dell'antigene SSA/Ro nelle cellule HEp-2000[®], campioni che contengono anticorpi anti-SSA/Ro mostrano valori dei titoli più alti su queste cellule rispetto ai valori ottenuti su cellule HEp-2 non transfette. Poiché nessun altro autoantigene nelle cellule HEp-2000[®] è influenzato dal processo di transfezione, i sieri con altre specificità auto-anticorpi non mostrano una significativa differenza di titolo tra la linea cellulare transfetta HEp-2000[®] e le cellule HEp-2 non transfette.

VALORI ATTESI

In un grande centro medico universitario, usando il substrato ANA cellulare HEp-2, sono stati generati i seguenti dati in un periodo di due anni (49), Tabella 1.

TABELLA 1

Diagnosi	Pattern Isolamento	% Positivo
Popolazione anormale (oltre 4.500 sieri analizzati):		
Lupus eritematoso sistemico	S, P+H, H, P	93
Artrite reumatoide	S, H	40
Malattia mista del tessuto connettivo	S	99
Sclerosi sistemica progressiva-diffusa	S, N	85
Sclerosi sistemica progressiva-CREST	ACA	93
Artrite reumatoide giovanile		
Sistemica	S	14
Poliarticolare	S	13
Pauciarticolare-B27+	-	0
DM/PM	S	25
Vasculite	S	20
Popolazione normale (oltre 9.000 sieri analizzati):		
20-60 anni	S	2
70-80 anni	S	3,5

Abbreviazioni: S=Punteggiato, H=Omogeneo, P=Periferico, N=Nucleolare, ACA=anti-Centromero

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

CAMPIONI NORMALI

Usando sistemi di analisi disponibili in commercio, e sistemi di analisi con cellule HEp-2 non transfette e sistema di analisi degli ANA-Ro Colorzyme[®] HEp-2000[®], sono stati testati in parallelo sieri di 500 donatori di sangue sani, 242 femmine e 258 maschi, nessuno dei quali aveva una storia nota di patologia reumatica. In questo gruppo, 36 campioni (7,2%) hanno dimostrato test anticorpo antinucleari positivi ad una diluizione di siero di 1:40. Per 34 campioni positivi su 36 i pattern della colorazione erano identici sui due substrati. I due campioni che mostravano differenze erano entrambi di pazienti femmine e fu confermato che entrambi contenevano anticorpi anti-SSA/Ro. Uno di questi campioni mostrava una debole reazione a chiazze sottili sulle cellule HEp-2 non transfette e la tipica colorazione "SSA/Ro" sul sistema di analisi degli ANA-Ro Colorzyme[®] HEp-2000[®]. L'altro campione era negativo

sulle cellule HEp-2 non transfette ma mostrava la tipica colorazione "SSA/Ro" sul sistema di analisi degli ANA-Ro Colorzyme® HEp-2000®. La specificità SSA/Ro di questi due campioni è stata confermata dal test ELISA e dalla tecnica Western immunoblot. I campioni negativi nelle analisi ANA sono risultati negativi anche con l'analisi ELISA.

SIERI DI PAZIENTI CON SOLO ANTICORPI SSA/Ro

Usando sistemi di test disponibili in commercio, cellule HEp-2 non transfette e il sistema di analisi ANA-Ro Colorzyme® HEp-2000®, sono stati analizzati i sieri di 46 pazienti con SLE o sindrome di Sjögren. È stato confermato dal test ELISA e dalla tecnica Western immunoblot che tutti questi sieri contenevano anticorpi contro l'autoantigene SSA/Ro. In nessuno di questi campioni sono stati rilevati altri anticorpi. Trentasei di questi campioni (78%) sono risultati positivi (disegno a chiazze) con le cellule HEp-2 non transfette e tutti (100%) sono risultati positivi (caratteristico disegno della colorazione SSA/Ro col sistema di analisi ANA-Ro Colorzyme® HEp-2000®).

SIERI DI PAZIENTI CON ANTICORPI DIVERSI DA SSA/Ro

Usando sistemi di analisi disponibili in commercio, cellule HEp-2 non transfette e il sistema di analisi ANA-Ro Colorzyme® HEp-2000®, sono stati testati sieri di 230 pazienti con una serie di patologie reumatiche e non reumatiche. In 120 campioni è stato rilevato un solo pattern della colorazione e pattern misti sono stati rilevati in 110 campioni. Nel totale dei 230 campioni, 333 pattern della colorazione sono risultati identici su entrambi i substrati. Ventinove campioni mostravano il caratteristico pattern della colorazione "SSA/Ro" sul sistema di analisi ANA-Ro Colorzyme® HEp-2000®. Ventitre di questi campioni mostravano pattern a chiazze sulle cellule HEp-2 non transfette. I sei campioni discrepanti (positivi su HEp-2000®, ma negativi su cellule HEp-2 non transfette) avevano tutti anticorpi SSA/Ro, come dimostrato dal caratteristico pattern della colorazione "SSA/Ro", dai test ELISA e dalla conferma della tecnica Western blot.

CONFRONTO DEI TITOLI

A causa della sovrapproduzione dell'antigene SSA/Ro nelle cellule HEp-2000®, campioni che contengono anticorpi anti-SSA/Ro mostrano valori dei titoli più alti su queste cellule rispetto ai valori ottenuti su cellule HEp-2 non transfette. Poiché nessun altro autoantigene nelle cellule HEp-2000® è influenzato dal processo di transfezione, i sieri con altre specificità auto-anticorpi non mostrano una significativa differenza di titolo tra la linea cellulare transfetta HEp-2000® e le cellule HEp-2 non transfette.

RIPRODUCIBILITÀ DEI TITOLI

Dieci campioni scelti da controlli CDC (Cell Division Cycle, ciclo di divisione cellulare) ed altri sieri ben caratterizzati, sono stati elaborati su tre diversi numeri di lotto di vetrini HEp-2000® in tre occasioni diverse. In nessun caso un campione negativo ha mostrato risultati positivi. Per tutti i campioni analizzati, tutti i valori dei titoli sono risultati entro una diluizione doppia del valore medio stabilito del titolo.

CONFERMA DEGLI ANTICORPI SSA/Ro

Usando il sistema di analisi ANA-Ro Colorzyme® HEp-2000®, in un grande laboratorio reumatologico, sono stati saggiati campioni di siero provenienti da 349 pazienti con test ANA positivi noti. In questo gruppo selezionato, 239 campioni mostravano il caratteristico pattern della colorazione SSA/Ro. Sono stati ottenute analisi ELISA positive per gli anticorpi SSA/Ro 238 (99,6%) di questi campioni. Altri 79 campioni hanno mostrato pattern fortemente chiazziati e/o omogenei e hanno dato origine a analisi ELISA positive per gli anticorpi SSA/Ro. Quindi, se si osserva il caratteristico pattern SSA/Ro, ciò conferma la presenza di anticorpi SSA/Ro ma l'assenza del pattern non esclude la possibile presenza di anticorpi SSA/Ro. Negli studi precedentemente descritti, abbiamo esaminato un totale di 429 sieri contenenti anticorpi SSA/Ro come confermato dall'analisi ELISA e/o dalla tecnica Western Immunoblot, e con il caratteristico pattern della colorazione SSA/Ro sulla linea cellulare HEp-2000®. Abbiamo anche notato campioni contenenti anticorpi SSA/Ro, ma senza il caratteristico pattern della colorazione SSA/Ro perché alti livelli di altri anticorpi, (in genere anticorpi anti-DNA o anticorpi anti-Sm/RNP) mascherano il pattern SSA/Ro. Quindi, se si vede il caratteristico pattern SSA/Ro, ciò conferma la presenza di anticorpi SSA/Ro ma l'assenza del pattern non esclude la possibile presenza di anticorpi SSA/Ro.

RIFERIMENTI

1. Robbins, W.C., Holman, H.R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:575-579, 1979.
2. Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. California Medicine 104:463-469, 1966.
3. Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 7:379-390, 1964.
4. Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D. Ed. by H. Busch, pp. 457-477, New York, Academic Press, 1979.
5. Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 41:73-80, 1980.
6. Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. J. Immunol. 123:2673-2681, 1979.
7. Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Antiperinuclear Factor. 1. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. Ann. Rheum. Dis. 38:248-251, 1979.
8. Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. Hum. Pathol. 9:85-91, 1978.

9. Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. Semin. Arthritis Rheum. 6:83-124, 1976.
10. Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. J. Invest. Dermatol. 62:526-534, 1974.
11. Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. Biol. Chem. 245:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochores) in Scleroderma Sera. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:1627-1631, 1980.
13. Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. Ann. Rheum. Dis. 38:74-78, 1979.
14. Sharp, G. C., Irwin, W. S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease—An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). Am. J. Med. 52:148-159, 1972.
15. Sharp, G. C., Irwin, W. S., May, L. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. N. Engl. J. Med. 295:1149-1154, 1976.
16. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. J. Clin. Invest. 55:1067-1073, 1975.
17. Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. Arthritis Rheum. 19:216-222, 1976.
18. Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. J. Clin. Invest. 59:176-178, 1977.
19. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration of Precipitation and Immunofluorescence. Arthritis Rheum. 19:711-719, 1976.
20. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
21. Kozin, F., Fowler, M., Koeth, S.M. A Comparison of the Sensitivities and Specificities of Different Substrates for the Fluorescent Antinuclear Antibody Test. Am. J. Clin. Pathol. 74:785-790, 1980.
22. McCarty, G.A., Rice, J. R. Characterization and Comparison of Available Antinuclear Antibody Kits Using Single Pattern Index Sera. J. Rheum. 7:339-347, 1980.
23. Hahon, N., Eckert, H. L., Stewart, J. Evaluation of Cellular Substrates for Antinuclear Antibody Determinations. J. Clin. Microbiol. 2:42-45, 1975.
24. Cleymaet, J. E., Nakamura, R.M. Indirect Immunofluorescent Antinuclear Antibody Tests: Comparison of Sensitivity and Specificity of Different Substrates. Am. J. Clin. Pathol. 58:388-393, 1972.
25. Harmon C.E., Deng J.S., Peebles C.L., Tan E.M.: The importance of tissue substrate in the SSA/Ro/Ro antigen-antibody system. Arthritis Rheum. 27:166-173, 1984.
26. Maddison P.J., Provost T.T., Reichlin M.: Serological findings in patients with "ANA negative" systemic lupus erythematosus. Medicine 60:87-94, 1981.
27. Itoh Y., Rader M.D., Reichlin M.: Heterogeneity of the Ro/SSA/Ro antigen and autoanti-Ro/SSA response: evidence of the four antigenically distinct forms. Clin. Exp. Immunol. 81:45-51, 1990.
28. Tan, E.M., Rodnan, G. P., Garcia, I., et al. Diversity of Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis. Arthritis Rheum. 23:617-625, 1980.
29. Miyachi, K., Fritzler, M. J., Tan, E.M. Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. J. Immuno. 121:2228-2234, 1978.
30. McCarty, G. A., Barada, F. A., Snyderman, R., et al. A New Autoantibody Staining Pattern, the Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics, Clinical Occurrence, and Cytoskeletal Studies. Arthritis Rheum. 24:S109, 1981.
31. McCarty, G. A., Valencia, D. W., Fritzler, M. J. Antibody to Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics and Cytological Studies. J. Rheum. 11:213-218, 1984.
32. Peter, V.B., Dawkins, R. L. Evaluating Autoimmune Disease. Diagnostic Medicine. Sept. - Oct. 1979.
33. Nakamura, R. M., Peebles, C. L. Molden, D. P., Tan, E. M., Advances in Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases. Laboratory Medicine 15 (No. 3): 190-198 (1984).
34. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. Ann. Int. Med. 83:464-469, 1975.
35. McDuffie, F. C., Burch, T.N. Immunologic Tests in the Diagnosis of Rheumatic Diseases. Bull. Rheum. Dis. 27:900-911, 1976.
36. Ritchie, R.F. Antinucleolar Antibodies. Their Frequency and Diagnostic Application. N.Engl. J. Med. 282:1174-1178, 1970.
37. Chan, E. K. L., Andrade, L. E. C. Antinuclear Antibodies in Sjögren's Syndrome. Rheum. Dis. Clin. North Am. 18:551-570, 1992.
38. Nakamura, R.M., Peebles, C.L., Penn, G.M. Antibodies to Nuclear Antigens (ANA): Atypical Indirect Immunofluorescent Test for Antibodies to Nuclear Antigens (ANA) in a Case of Idiopathic Thrombocytopenia. Clinical Immunology Check Sample No. C-1-20. American Society of Clinical Pathologists, 1980.
39. Fritzler, M. J., Valencia, D.W., McCarty, G.A. Speckled Pattern Antinuclear Antibodies Resembling Anticentromere Antibodies. Arthritis Rheum. 27:92-96, 1984.
40. Gabbiani, G., Ryan, G.B., Lamelin, J.P., et al. Human Smooth Muscle Antibody. Am. J. Pathol. 72:473-488, 1973.
41. Mead, G.M., Cowin, P., Whitehouse, J.M.A. Antitubulin Antibody in Healthy Adults and Patients with Infectious Mononucleosis and its Relationship to Smooth Muscle Antibody (SMA). Clin. Exp. Immunol. 39:328-336, 1980.
42. Klatskin, G., Kantor, F.S. Mitochondrial Antibody in Primary Biliary Cirrhosis and Other Diseases. Ann. Int. Med. 77:553-541, 1972.
43. McMillan, S.A., Haire, M. Smooth Muscle Antibody in Patients with Warts. Clin. Exp. Immunol. 21:339-344, 1975.
44. Anderson, P., Small, J.V., Sobieszek, A. Studies on the Specificity of Smooth Muscle Antibodies. Clin Exp. Immunol. 26:57-66, 1976.
45. Lidman, K., Biberfeld, G., Fagraeus, A., et al. Anti-actin Specificity of Human Smooth Muscle Antibodies in Chronic Active Hepatitis. Clin. Exp. Immunol. 24:266-272, 1976.
46. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. Arch. Int. Med 117:620-626, 1966.
47. Fritzler, M.J., Tan, E.M. Antibodies to Histones in Drug-Induced and Idiopathic Lupus Erythematosus. J. Clin. Invest. 62:560-567, 1978.
48. Gladman, D.D., Chalmers, A., Urowitz, M.B. Systemic Lupus Erythematosus with Negative LE Cells and Antinuclear Factors. J. Rheum. 5:142-147, 1978.
49. Data on file. Duke University Medical Center, Durham, North Carolina.

In caso di danni all'imballaggio protettivo, contattare Immuno Concepts prima dell'uso.



Fornitore



Rappresentante autorizzato
nella Comunità Europea



Limitazione Di
Temperatura



Contiene sufficiente per <n> test



Leggere le istruzioni
per l'uso



Dispositivo Medico Diagnostico In vitro



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
 Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
 Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

PROCEDURA DI ANALISI IN COLORZYME® DEGLI ANA-Ro HEP-2000®

NOTA: Se il laboratorio sta utilizzando un preparatore automatico di campioni, si devono seguire la procedura e le raccomandazioni del produttore del preparatore stesso. Il preparatore di vetrini dovrebbe essere programmato affinché la diluizione dei campioni, la dispensazione dei volumi e i tempi di incubazione siano appropriati come sottolineato di seguito.

- 1. RICOSTITUZIONE DEL TAMPONE (PBS)**
Sciogliere il contenuto di una busta di tampone in un litro di acqua deionizzata o distillata. Il tampone PBS può essere coperto e conservato a 2-25°C fino a quattro settimane.
- 2. RICOSTITUZIONE DEL REAGENTE COLORATO**
Mescolare bene fino al completo dissolvimento. Questo reagente colorato è stabile per 30 giorni a temperatura ambiente in un contenitore chiuso. Questo reagente colorato può essere riutilizzato fino a 30 giorni o fino a che è visibile un cambiamento di colore o un precipitato. Torbidezza o opalescenza, senza alcun precipitato visibile al momento del riutilizzo, sono normali. A seconda della frequenza d'uso, è possibile utilizzare fino a venti vetrini con 150 ml di reagente colorato Colorzyme®.
- 3. DILUIZIONE DEI CAMPIONI DEI PAZIENTI**
Screening: diluire i campioni dei pazienti a 1:40 aggiungendo 0,05 ml (50 µl) di siero a 1,95 ml di PBS ricostituito.
Titolo semi-quantitativo: fare delle diluizioni seriali del/i campione/i dello screening (ad es. 1,80, 1,160, 1,320...etc.) usando il PBS.
- 4. PREPARAZIONE DEI VETRINI DEL SUBSTRATO (20-25 µl/pozzetto)**
Rimuovere il/i vetrino/i dal contenitore/i e porre i sieri di controllo sui pozzetti di controllo come descritto di seguito. Capovolgere il flacone contagocce di controllo e premere delicatamente fino a che in punta è visibile la goccia. Appoggiare delicatamente la goccia sul pozzetto di controllo appropriato evitando il contatto diretto della punta del contagocce con la superficie del vetrino. Aggiungere 1 goccia (20-25 µl) di campione del paziente ai pozzetti numerati.
NOTA: per uno screening generale, si raccomanda il controllo positivo omogeneo. Per titolazione semi-quantitativa scegliere il controllo positivo che mostra il pattern di colorazione più simile al campione dello screening (ad es., per un campione del paziente che nello screening dà un pattern di colorazione a chiazze, usare il controllo positivo a chiazze). Se il test ANA HEP-2000® deve essere usato per confermare la presenza di anticorpi anti-SSA/Ro, il controllo positivo SSA/Ro, nel catalogo al codice n. 2035-Ro, deve essere eseguito su almeno un vetrino di quel giorno.
ATTENZIONE: IL CONTATTO DIRETTO DELLA PUNTA DEL CONTAGOCCE CON LA SUPERFICIE DEL VETRINO PUÒ DANNEGGIARE IL SUBSTRATO ANTIGENE.
- 5. INCUBAZIONE DEI VETRINI (30 ± 5 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**
Mettere il/i vetrino/i in una camera umida, coperta (una capsula di Petri con carta assorbente inumidita andrà bene). Incubare, col coperchio, per 30 minuti (± 5 minuti) a temperatura ambiente (18-25°C).
- 6. RISCIAQUO CON PBS**
Rimuovere il/i vetrino/i dal piatto dell'incubatore e sciacquare brevemente con PBS usando una bottiglia a zampillo, una pipetta di Pasteur o una pipetta sierologica. Non far zampillare il tampone direttamente sui pozzetti.
NOTA: per evitare la contaminazione incrociata sui vetrini con 13 pozzetti, orientare il flusso di PBS lungo la linea mediana del vetrino, inclinando prima verso le provette 1-5 e poi verso quelle 6-10.
- 7. LAVAGGIO COL PBS (10 minuti)**
Lavare il/i vetrino/i per 10 minuti con PBS in un piatto per la colorazione del vetrino o una vaschetta Coplin. Questo lavaggio può durare fino a 10-30 minuti senza che i risultati finali dell'analisi varino. Eliminare la soluzione di lavaggio PBS dopo l'uso.
- 8. REAGENTE ANTICORPO ENZIMATICO (coprire i pozzetti con 12-14 gocce)**
Rimuovere uno alla volta i vetrini dal PBS e immergerli 3-5 volte in acqua deionizzata o distillata. Tamponare il vetrino sul lato con carta bibula o con carta assorbente in modo da eliminare l'acqua in eccesso. Riportare immediatamente il vetrino nella camera di incubazione e coprire completamente i pozzetti usando il reagente anticorpo enzimatico; iniziare mettendo una goccia su ogni pozzetto. Ripetere l'operazione per ciascun vetrino. Il reagente anticorpo enzimatico è stato titolato al fine di compensare l'acqua deionizzata o distillata residua che resta sul vetrino dopo il risciacquo.
NOTA: è importante che i pozzetti dei vetrini non si asciugino durante questa procedura onde evitare il danneggiamento del substrato.
TAMPONARE O ASCIUGARE IL VETRINO IN MANIERA CHE LO STESSO NON RESTI SENZA REAGENTE ANTICORPO ENZIMATICO PER PIÙ DI 15 SECONDI.
- 9. INCUBAZIONE DEI VETRINI (30 ± 5 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**
Mettere il coperchio sulla camera di incubazione e incubare il/i vetrino/i per 30 minuti (± 5 minuti) a temperatura ambiente (18-25°C).
- 10. RISCIAQUO COL PBS**
Rimuovere il/i vetrino/i dal piatto dell'incubatore e sciacquare brevemente con PBS. Non far zampillare il tampone direttamente sui pozzetti.
- 11. LAVAGGIO COL PBS (10 minuti)**
Lavare il/i vetrino/i per 10 minuti con PBS in un piatto per la colorazione del vetrino o una vaschetta Coplin. Questo lavaggio può durare fino a 10-30 minuti senza che i risultati finali dell'analisi varino.
- 12. INCUBAZIONE DEL REAGENTE COLORATO (30 minuti a temperatura ambiente, ovvero 18-25°C)**
Rimuovere uno alla volta i vetrini dal PBS e immergerli 3-5 volte in acqua deionizzata o distillata e tamponare il vetrino sul lato con carta bibula o carta assorbente in modo da rimuovere l'acqua in eccesso. Mettere immediatamente il/i vetrino/i in una vaschetta Coplin contenente reagente colorato attivato ed incubare per 30 minuti.
- 13. RISCIAQUO COL PBS**
Rimuovere un vetrino alla volta dalla vaschetta Coplin e sciacquare ciascun lato del vetrino per 4-5 secondi con PBS. Non far zampillare il tampone direttamente sui pozzetti. Mettere ciascun vetrino risciacquato con PBS in una vaschetta Coplin piena di acqua deionizzata o distillata fino a che tutti i vetrini sono stati tolti dal reagente colorato. Passare subito al punto 14.
- 14. MONTAGGIO DEL VETRINO COPRIOGGETTI**
Rimuovere uno alla volta i vetrini dal acqua deionizzata o distillata e tamponare il vetrino sul lato con carta bibula o carta assorbente in modo da rimuovere l'acqua in eccesso. **NON TAMPONARE O NON ASCIUGARE IL VETRINO IN MANIERA CHE RIMANGA SENZA COPRIVETRINO PER PIÙ DI 15 SECONDI.** Aggiungere 4-5 gocce di mezzo di fissaggio semipermanente lungo la linea mediana di ciascun vetrino. Posizionare con attenzione il vetrino coprioggetto, evitando vuoti d'aria, abbassando delicatamente il vetrino coprioggetto da un estremo all'altro del vetrino.
NOTA: un eccesso di mezzo di fissaggio sul vetrino può avere come risultato la mancanza di risoluzione chiara delle cellule (immagine sfocata). L'eccesso del mezzo di fissaggio può essere eliminato dal vetrino tamponando delicatamente il vetrino coprioggetto con carta assorbente o carta per pulire lenti evitando qualsiasi movimento diretto del vetrino coprioggetto. I vetrini possono essere letti immediatamente oppure possono essere conservati per lungo tempo ad una temperatura di 2-10°C senza alcuna perdita di reattività.

PER ASSISTENZA TECNICA: +1-916-363-2649
oppure a mezzo e-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com