



SISTEMA DI ANALISI IN FLUORESCENZA DEGLI ANA

Per uso diagnostico in vitro

Per Uso Professionale

USO PREVISTO: analisi in fluorescenza indiretta degli anticorpi per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi antinucleari nel siero umano. 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 malattia 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 patologie del tessuto connettivo (20).

La sensibilità dell'analisi 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 sistema di analisi ANA della Immuno Concepts con cellule epitelioidei umane mitotiche* (HEp-2) rappresenta una tecnica avanzata di immunofluorescenza per il rilevamento di ANA. È stato dimostrato che, nel rilevamento di anticorpi nella sclerosi sistemica progressiva (PSS) (25), 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 aiutano nel riconoscimento del pattern differenziale come pure nel rilevamento di antigeni nucleari non riportati precedentemente, presenti in concentrazioni più elevate nelle cellule mitoticamente attive (26-28).

PRINCIPIO DEL TEST

Il sistema di analisi in fluorescenza degli ANA IC utilizza il metodo dell'immunofluorescenza indiretta, descritto per la prima volta da Weller e Coons (29). I campioni 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.

**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.*

Dopo il lavaggio per rimuovere anticorpi non specificamente legati, il substrato viene incubato con un anticorpo anti-umano coniugato con fluoresceina. Quando i risultati sono positivi, avviene la formazione di un complesso stabile in tre parti composto dall'anticorpo fluorescente legato all'anticorpo antinucleare umano che è legato all'antigene nucleare. Tale complesso può essere visualizzato con l'ausilio di un microscopio a fluorescenza. Nei campioni positivi, i nuclei delle cellule mostreranno una fluorescenza verde mela con un pattern di colorazione caratteristico della particolare distribuzione dell'antigene nucleare nelle cellule. Se il campione è negativo all'ANA, il nucleo non mostrerà un pattern di fluorescenza nucleare chiaramente distinguibile.

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 (tranne il tampone PBS che deve essere sciolto 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.

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-2 (con figure mitotiche) coltivate e stabilizzate direttamente sui pozzetti per analisi. 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 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-2 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 a colorazione a chiazze più comunemente viste sul substrato cellulare HEp-2 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 a colorazione nucleolare sul substrato cellulare HEp-2 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 mostra una discreta reazione a colorazione a chiazze sul substrato cellulare HEp-2 della Immuno Concepts. La regione cromosomica delle cellule mitotiche mostra la stessa discreta reazione a 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. Vedere l'etichetta della fiala per il valore del titolo.

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 debole fluorescenza del citoplasma con colorazione più brillante della regione non cromosomica della cellula mitotica, esso dimostra un pattern non distinguibile di colorazione nucleare.

Reagente anticorpo fluorescente **CONJ|FITC:** numero di catalogo 2009 (9,0 ml), 2075 (23 ml), 2009CS (9,0 ml), 2075CS (23 ml). Anti-IgG umane coniugata con FITC (fluorescein isothiocyanate, fluoresceina isotiocianato). 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.

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 non compaiono 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 da un litro (per tampone PBS)
Acqua deionizzata o distillata
Provette per preparare le diluizioni dei sieri
Carta bibula o assorbente
Camera per incubazione
Guanti a perdere
Timer da laboratorio
Microscopio a fluorescenza dotato di filtro eccitatore da 495 nm e filtro di sbarramento da 515 nm

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 in cui 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.

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 temperatura di -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 luminosa fluorescenza verde mela nei nuclei delle cellule, con un pattern chiaramente distinguibile, caratteristico del siero di controllo usato. Il controllo negativo dovrebbe mostrare una fluorescenza a bassa intensità, color verde opaco non specifica sia nel citoplasma che nel nucleo, ma senza alcun pattern distinguibile della colorazione nucleare. Il controllo PBS si usa per osservare la colorazione non specifica da parte del reagente anticorpo, e non dovrebbe mostrare alcuna fluorescenza verde. Se i controlli non appaiono come descritto, il test non è valido e deve essere ripetuto.

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 per questo numero di lotto 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 in fluorescenza degli ANA 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 fluorescenza 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 fluorescente.

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 tipo di fonte luminosa usata. Fonti luminose al mercurio producono una maggiore energia di eccitazione a 495 nm rispetto a quelle al quarzo/alogene. Le fonti luminose al mercurio da 50 watt, 100 watt e 200 watt differiscono poco nell'energia di eccitazione a 495 nm. Fonti luminose al quarzo/alogene da 100 watt generano una maggiore energia di eccitazione a 495 nm rispetto a quelle al quarzo/alogene da 50 watt.
2. La condizione e l'età della fonte di luce. Questo in particolare per le fonti luminose al mercurio che in genere mostrano una graduale riduzione nell'energia di eccitazione a 495 nm prima di esaurirsi. Questa riduzione graduale dell'energia di eccitazione può comportare una significativa perdita di sensibilità dopo diverse settimane. Questo problema può essere evitato tenendo una registrazione dei tempi. Per risultati ottimali, sostituire le lampadine a mercurio da 50 watt dopo 100 ore e quelle da 100 o 200 watt dopo 200 ore. Le fonti luminose al quarzo/alogene in genere non mostrano una graduale riduzione dell'energia di eccitazione prima di esaurirsi.
3. Il tipo di filtro di eccitazione usato. I filtri eccitatori ad interferenza danno maggiore sensibilità in una lunghezza d'onda molto più ridotta rispetto ai filtri eccitatori ad assorbimento. Per maggiori informazioni, consultare il manuale del proprio microscopio a fluorescenza o contattare il rappresentante.
4. Il giusto allineamento del percorso ottico del microscopio. Per istruzioni, consultare il manuale del proprio microscopio a fluorescenza.
5. L'apertura numerica dell'obiettivo. Con fluorescenza a luce incidente (Epi), la fluorescenza cresce in modo esponenziale man mano che aumenta anche l'apertura numerica (NA) dell'obiettivo. Questo può far sì che un obiettivo da 40X con una NA di 0,65 legga una o più diluizioni più basse rispetto ad un obiettivo da 40X con un NA di 0,85. L'apertura numerica è stampata sul lato dell'obiettivo.
6. I filtri a soppressione. I filtri a soppressione riducono le specifiche lunghezze d'onda dell'eccitazione e possono essere usati per ridurre la sensibilità. Per maggiori informazioni, vedere il manuale del proprio microscopio a fluorescenza o contattare il rappresentante.
7. La precisione e l'accuratezza della tecnica di diluizione, dell'apparecchiatura e della performance delle procedure di analisi.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL PAZIENTE

Per lo 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.

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.

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 (30).

INTENSITÀ DELLA FLUORESCENZA

L'intensità della fluorescenza può essere semiquantificata attraverso le seguenti linee guida per i reagenti di anticorpi fluorescenti stabilite dai CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Centri per il controllo e la prevenzione delle patologie) di Atlanta, Georgia.

- 4+ Giallo-verde brillante (fluorescenza massima): profilo cellulare netto, centro della cellula nettamente definito.
- 3+ Fluorescenza giallo-verde meno brillante: profilo cellulare netto, centro della cellula nettamente definito.
- 2+ Pattern cellulare definito ma fluorescenza debole: profilo cellulare ben definito.
- 1+ Fluorescenza molto tenue: nella maggior parte dei casi profilo cellulare quasi non distinguibile dal centro della cellula.

Per la determinazione di queste intensità di fluorescenza è disponibile il vetrino standard FITC QC Slide™, numero di catalogo 1900, della Immuno Concepts, N.A. Ltd.

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 una colorazione 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 (31).

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 (31).

A chiazze: una colorazione grossolana o finemente granulare 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 (32).

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 (33).

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).

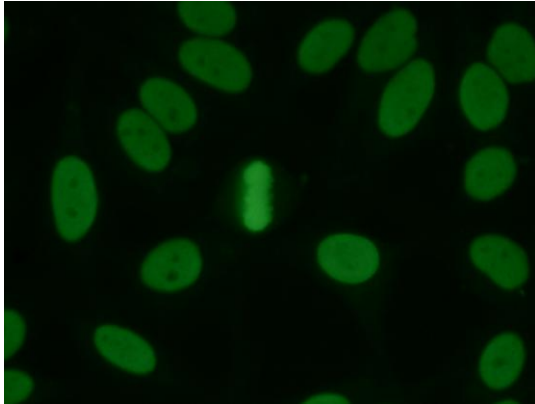
Sinonimi: ACA; a chiazze discrete.

Antigeni nucleari: centromero cromosomico (cinetocoro).

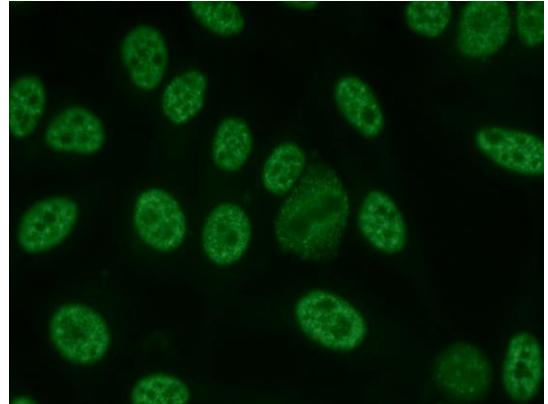
Associazione con patologie: fortemente indicativo della sindrome CREST variante della sclerosi sistemica progressiva (25).

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

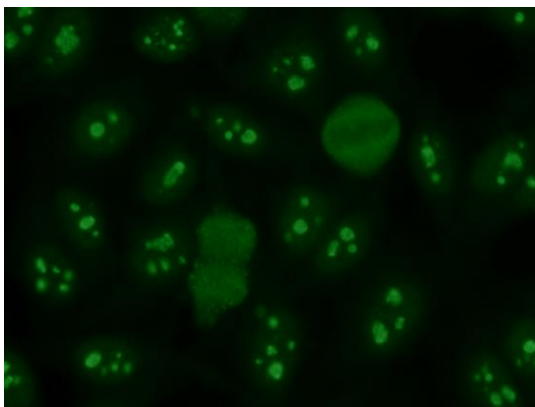
PATTERN BASILIARA DELLA COLORAZIONE



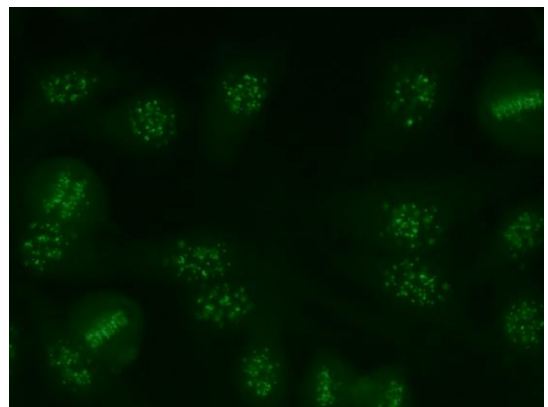
Omogeneo



Punteggiato



Nucleolare



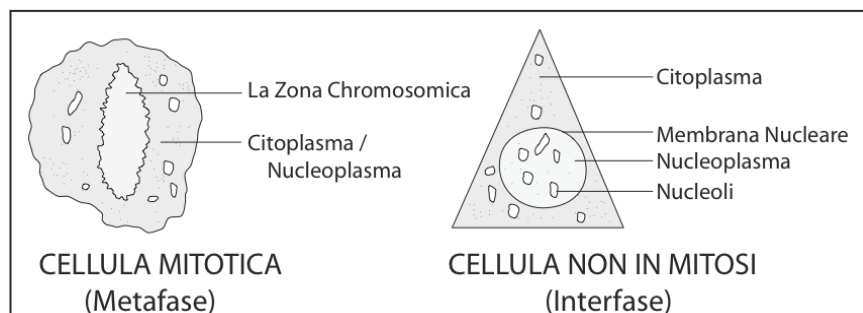
Centromero

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 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 Immuno Concepts) le cellule mitotiche non mostreranno una colorazione cromosomica e saranno difficili da osservare.



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 ci sarà 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 (34).

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 ha né specificità cinetocoro né associazione con la variante CREST della sclerodermia (35). Se la regione cromosomica non si colora, l'anticorpo non è anti-centromero e va riportato come "a chiazze atipico".

FLUORESCENZA 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 (36). 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 (37-38). Usando il substrato cellulare HEp-2, è stato anche dimostrato l'anticorpo del muscolo liscio in pazienti con verruche (39).

Anticorpo anti-mitocondriale (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 all'actina (40-41).

RIPORTARE I SIERI COME NEGATIVI PER L'ANTICORPO ANTINUCLEARE E VERIFICARE I POSITIVI PER L'ANTICORPO ANTIMUSCOLO 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 (42). Pazienti con LE indotto da farmaci possono mostrare ANA positivi omogenei o omogenei/periferici comunemente diretti contro gli istoni nucleari (43).
4. Una piccola percentuale di pazienti con SLE può non dimostrare degli ANA per mezzo di immunofluorescenza indiretta anche se può mostrare ANA mediante altre tecniche (44).
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. A causa delle numerose opzioni disponibili nei microscopi a fluorescenza, si raccomanda di standardizzare le fonti luminose, i filtri e gli strumenti ottici in caso di confronto dei titoli dei pazienti tra i vari laboratori.
8. Gli ANA positivi sono osservabili anche in una piccola percentuale di pazienti con malattie infettive e/o neoplastiche (9).

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 (45). 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

Il sistema di analisi della Immuno Concepts ANA è stato valutato in confronto con altre analisi in fluorescenza degli anticorpi in distribuzione sul mercato (45). Per lo studio sono stati utilizzati 97 campioni di siero di individui normali e con diagnosi comprendenti lupus eritematoso sistemico (SLE), malattia mista del tessuto connettivo (MCTD), variante CREST della sclerosi sistemica progressiva di Raynaud (PSS-CREST), artrite reumatoide (RA), artrite reumatoide giovanile (JRA) ed altre malattie del tessuto connettivo. I sieri sono stati testati alle diluizioni di screening raccomandate da ciascun produttore. Nella tabella numero 2 che segue sono riassunti i risultati dello studio.

TABELLA 2

DIAGNOSI	Numero di pazienti	Immuno Concepts Positivi 1:40	Positivi Cellule KB1:20	Topo Rene Positivi 1:20
SLE	23	23	22	21
MCTD/coincidenti	7	7	6	4
PSS-CREST di Raynaud	17	17	16	7
RA	2	2	2	0
JRA	4	4	4	3
Altre malattie del tessuto connettivo	9	9	9	6
Controlli ospedalizzati	11	7	3	2
Controlli normali	24	1	1	0

I pazienti positivi nella categoria "altre malattie del tessuto connettivo" sul substrato IC avevano artrite temporanea (1), patologia indifferenziata del tessuto connettivo (1), polmiositi (2), monoartrite (2), poliartrite (3) e non ulteriormente classificabile.

I controlli ospedalizzati con ANA positivi su substrato IC avevano diabete (2), artrite non classificabile (3), ipotiroidismo (1) e malattia renale da immunocomplessi (1) che non corrispondevano ai criteri della diagnosi di SLE.

RIFERIMENTI

- 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.
- Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. California Medicine 104:463-469, 1966.
- Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 7:379-390, 1964.
- 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.
- Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. Clin. Exp. Immunol. 41:73-80, 1980.
- 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.
- 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.
- Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. Hum. Pathol. 9:85-91, 1978.
- Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. Semin. Arthritis Rheum. 6:83-124, 1976.
- Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. J. Invest. Dermatol. 62:526-534, 1974.
- 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.
- Moroi, Y., Peebles, C., Fritzier, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:1627-1631, 1980.
- Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. Ann. Rheum. Dis. 38:74-78, 1979.
- 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.
- 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.
- Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. J. Clin. Invest. 55:1067-1073, 1975.
- 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.
- Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. J. Clin. Invest. 59:176-178, 1977.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hahon, N., Eckert, H. L., Stewart, J. Evaluation of Cellular Substrates for Antinuclear Antibody Determinations. J. Clin. Microbiol. 2:42-45, 1975.
- 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.
- Tan, E.M., Rodnan, G. P., Garcia, I., et al. Diversity of Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis. Arthritis Rheum. 23:617-625, 1980.
- Miyachi, K., Fritzier, M. J., Tan, E.M. Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. J. Immuno. 121:2228-2234, 1978.
- 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.
- McCarty, G. A., Valencia, D. W., Fritzier, M. J. Antibody to Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics and Cytological Studies. J. Rheum. 11:213-218, 1984.

29. Weller, T.H., Coons, A.H. Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86:789-794, 1954.
30. Peter, V.B., Dawkins, R. L. Evaluating Autoimmune Diseases. Diagnostic Medicine. Sept. - Oct. 1979.
31. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. Ann. Int. Med. 83:464-469, 1975.
32. McDuffie, F. C., Burch, T.N. Immunologic Tests in the Diagnosis of Rheumatic Diseases. Bull. Rheum. Dis. 27:900-911, 1976.
33. von Mühlen, C. A., Tan, E. M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. Sem. in Arthritis and Rheum. 24:323-358, 1995.
34. 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.
35. Fritzler, M. J., Valencia, D.W., McCarty, G.A. Speckled Pattern Antinuclear Antibodies Resembling Anticentromere Antibodies. Arthritis Rheum. 27:92-96, 1984.
36. Gabbiani, G., Ryan, G.B., Lamelin, J.P., et al. Human Smooth Muscle Antibody. Am. J. Pathol. 72:473-488, 1973.
37. 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.
38. Klatskin, G., Kantor, F.S. Mitochondrial Antibody in Primary Biliary Cirrhosis and Other Diseases. Ann. Int. Med. 77:553-541, 1972.
39. McMillan, S.A., Haire, M. Smooth Muscle Antibody in Patients with Warts. Clin. Exp. Immunol. 21:339-344, 1975.
40. Anderson, P., Small, J.V., Sobieszek, A. Studies on the Specificity of Smooth Muscle Antibodies. Clin Exp. Immunol. 26:57-66, 1976.
41. 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.
42. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. Arch. Int. Med 117:620-626, 1966.
43. Fritzler, M.J., Tan, E.M. Antibodies to Histones in Drug-Induced and Idiopathic Lupus Erythematosus. J. Clin. Invest. 62:560-567, 1978.
44. Gladman, D.D., Chalmers, A., Urowitz, M.B. Systemic Lupus Erythematosus with Negative LE Cells and Antinuclear Factors. J. Rheum. 5:142-147, 1978.
45. Data on file at Immuno Concepts.

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

Cat 2000-I,

4.11.02.003.089-It

Rev 5.2 © Copyright 2020

PROCEDURA DI ANALISI IN FLUORESCENZA DEGLI ANA

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. 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.
 - 3. 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 fluorescenza più simile al campione dello screening (ad es., per un campione del paziente che nello screening dà un pattern di fluorescenza a chiazze, usare il controllo positivo punteggiato).
ATTENZIONE: IL CONTATTO DIRETTO DELLA PUNTA DEL CONTAGOCCE CON LA SUPERFICIE DEL VETRINO PUÒ DANNEGGIARE IL SUBSTRATO ANTIGENE.
 - 4. INCUBAZIONE DEI VETRINI (30 ± 5 minuti a temperatura ambiente, cioè 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).
 - 5. 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, orientare il flusso di PBS lungo la linea mediana del vetrino, inclinandolo prima verso la fila di pozzetti superiore e poi verso quella inferiore.
 - 6. 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.
 - 7. REAGENTE ANTICORPO FLUORESCENTE (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 fluorescente; iniziare mettendo una goccia su ogni pozzetto. Ripetere l'operazione per ciascun vetrino. Il reagente anticorpo fluorescente 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 FLUORESCENTE PER PIÙ DI 15 SECONDI.
- 8. INCUBAZIONE DEI VETRINI (30 ± 5 minuti a temperatura ambiente, cioè 18-25°C)**
Mettere il coperchio sulla camera di incubazione e coprire con carta assorbente per impedire l'esposizione alla luce se la cella non è opaca. Lasciare incubare il/i vetrino/i per 30 minuti (± 5 minuti) a temperatura ambiente (18-25°C).
 - 9. 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.
 - 10. 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 cambino quando non si usa colorante di contrasto.
Colorante di contrasto opzionale: aggiungere 5-10 gocce di colorante di contrasto (blu di Evans allo 0,5%) per 100 ml di PBS prima di immergere il vetrino. Poiché il grado di colorazione di contrasto desiderato può variare da un individuo all'altro, l'intensità della colorazione di contrasto può essere aumentata o diminuita semplicemente regolando il numero di gocce aggiunte al PBS in questo lavaggio.
 - 11. MONTAGGIO DEL VETRINO COPRIOGGETTI**
Rimuovere uno alla volta i vetrini dal PBS e immergerli 3-5 volte in acqua deionizzata o distillata (Opzionale). Tamponare il vetrino sul lato con carta bibula o con carta assorbente in modo da eliminare l'acqua in eccesso.
TAMPONARE O ASCIUGARE IL VETRINO IN MANIERA CHE NON 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: una quantità eccessiva di mezzo di fissaggio sul vetrino può causare un'alta fluorescenza di fondo, dovuta alla dispersione della luce o alla 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.

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