



HEp-2000[®] SISTEMA ANA-Ro IN IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA

Per uso diagnostico in vitro

Per Uso Professionale

SPECIFICHE D'USO: Questo è un test con anticorpi fluoresceni indiretto per il rilevamento semiquantitativo di anticorpi antinucleari IgG (ANA) in siero umano, da effettuarsi manualmente tramite microscopio a fluorescenza o con il microscopio semiautomatico a fluorescenza Image Navigator[®]. Questo test usa cellule HEp-2 transfettate[†], che permettono l'identificazione specifica di anticorpi contro l'antigene SSA/Ro. Gli autoanticorpi anti-SSA/Ro potrebbero presentare un tipico pattern di colorazione sulle cellule transfettate. Quando tale pattern si manifesta, viene considerato una prova della presenza di anticorpi anti-SSA/Ro.

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

Ne è previsto l'uso come ausilio nel rilevamento degli anticorpi correlati alle malattie reumatiche sistemiche, in congiunzione con altre risultanze di laboratorio e cliniche. I risultati ottenuti tramite il dispositivo semiautomatico Image Navigator[®] e il software devono essere confermati da un operatore esperto.

SINTESI E SPIEGAZIONI DEL TEST

La definizione anticorpi antinucleo (ANA) è generica e indica gli auto anticorpi diretti contro varie proteine del nucleo cellulare. Da tempo studi su questi autoanticorpi, eseguiti con tecniche in immunofluorescenza, hanno rivelato una reazione selettiva verso poche proteine nucleari specifiche (1). Essendoci una buona correlazione tra un risultato ANA positivo e la presenza di un Lupus Eritematoso Sistemico in atto (LES), un risultato ANA negativo escludeva invece questapatologia (2).

Sebbene gli anticorpi specifici diretti verso il DNA dimostrino sempre un'alta correlazione con il LES (3), è ora noto che numerose macromolecole nucleari (4) e citoplasmatiche (5-7) possono essere associate con altre malattie del tessuto connettivo (8-10). Alcuni di questi anticorpi sembrano assumere un significato diagnostico e/ o prognostico nella sclerosi sistemica progressiva (11-12), nella collagenopatia (13-15), nella Sindrome di Sjögren (16-17), nella polimiosite (18) e/o nell'artrite reumatoide (19). A causa dell'associazione con queste patologie, il test ANA viene ora ritenuto uno strumento di screening generale nelle patologie del tessuto connettivo (20).

La sensibilità del test ANA varia a seconda del tipo di substrato usato, della procedura di fissazione e dei tipi d'ANA presenti nel siero. I substrati ottenuti da colture cellulari generalmente dimostrano una maggior sensibilità delle sezioni tissutali (21-24). La ricerca d'autoanticorpi contro l'antigene SSA/Ro è particolarmente variabile. I tessuti dei roditori non contengono livelli rilevabili dell'antigene SSA/Ro (25) e la sensibilità verso anticorpi anti-SSA/Ro presenti in substrati ottenuti da colture cellulari varia dal 50 al 90% (26-27).

[†]Le cellule transfettate e il loro uso sono protetti dal brevetto statunitense 5.518.881.

Il test ANA in immunofluorescenza indiretta con cellule HEp-2000® della Immuno Concepts basato su cellule epiteliali umane HEp-2 transfettate in mitosi*, rappresenta un metodo d'immunofluorescenza all'avanguardia nella ricerca degli ANA. Le cellule HEp-2 aventi un elevato indice mitotico hanno dimostrato una maggiore sensibilità nel riconoscimento delle figure mitotiche associate agli anticorpi della sclerodermia diffusa rispetto alla tecnica che usa come substrato il rene di topo (28). L'uso delle figure mitotiche è di fondamentale importanza nel riconoscimento differenziale dei patterns e di antigeni nucleari non rilevati in precedenza e presenti in concentrazioni più elevate nelle cellule mitotiche attive (29-31). Le cellule HEp-2 di questo sistema diagnostico vengono transfettate con copie multiple della sequenza specifica del DNA che porta le informazioni per la sintesi dell'autoantigene SSA/Ro. Circa il 10-20% delle cellule transfettate sovraesprimono quest'antigene, quindi la scoperta di autoanticorpi SSA/Ro specifici è maggiore che nelle HEp-2 non transfettate. Autoanticorpi SSA/Ro specifici mostrano un pattern dalla colorazione caratteristica nelle cellule transfettate. La visualizzazione del pattern specifico SSA/Ro è da considerarsi conferma della presenza nel campione di anticorpi anti-SSA/Ro.

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

IL PRINCIPIO DEL TEST

Il nostro Test Kit ANA IFA usa la tecnica dell'immuno fluorescenza indiretta descritta per la prima volta da Weller e Coons (32). Campioni di siero in esame sono incubati con il substrato cellulare (antigene) per consentire la reazione specifica degli autoanticorpi verso i nuclei cellulari. In presenza di ANA si forma un complesso antigene-anticorpo stabile. Dopo un lavaggio che serve a rimuovere anticorpi non specifici dal vetrino, il substrato viene nuovamente incubato con un anticorpo anti-Globuline umane coniugato con la fluoresceina. Quando il risultato è positivo, avviene la formazione di un immunocomplesso stabile a tre componenti dato dall'anticorpo fluorescente legato all'anticorpo antinucleare umano il quale è a sua volta legato all'antigene nucleare. Questo complesso viene visualizzato mediante l'uso di un microscopio in fluorescenza. Nei campioni positivi i nuclei delle cellule mostreranno una fluorescenza verde-mela con una colorazione caratteristica dovuta alla particolare distribuzione dell'antigene nucleare nelle cellule. Se l'esemplare è negativo per ANA, il nucleo non mostrerà un pattern chiaramente discernibile di fluorescenza nucleare.

COMPONENTI DEL KIT - MATERIALI FORNITI

Uso: tutti i componenti sono forniti pronti per l'uso senza bisogno d'aliquotare o di ricostituire le soluzioni (tranne il tampone PBS che deve essere disciolto in acqua deionizzata o distillata prima dell'uso).

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

Stabilità: Tutti i componenti rimangono stabili, sia nel kit chiuso che dopo l'apertura, per almeno 12 mesi dalla data di produzione. Non utilizzare nessun componente oltre la data di scadenza.

REAGENTI REATTIVI

Vetrini con Substrato **SLIDE:** Vetrini con il substrato ANA che utilizzano cellule HEp-2000® ad alto indice mitotico cresciute e fissate direttamente sulle pareti dei pozzetti. Queste sono cellule HEp-2 transfettate in modo stabile con l'antigene SSA/Ro. Un modello originale 'a fossato' impedisce un'eventuale contaminazione tra i vari pozzetti durante lo studio. La busta del vetrino viene riempita con un gas inerte non tossico che favorisce la stabilità delle cellule. I vetrini sono disponibili con 7, 13, 14, 18 o 21 pozzetti, in base alle necessità del laboratorio.

Controllo Positivo SSA/Ro **CONTROL +:** n. 2035-Ro del catalogo. Fiala contagocce pronta all'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpo IgG specifici per antigeni SSA/Ro. Questo siero presenta la colorazione finemente maculata tipica degli anticorpi anti-SSA/Ro visibile sul substrato cellulare HEp-2000®. L'espressione è soprattutto a livello nucleare, con colorazione prevalente dei nucleoli. Può essere vista nelle cellule sovraesprese anche una debole colorazione del citoplasma. La regione cromosomica delle cellule mitotiche presenta una reazione con colorazione negativa.

*Mitosi è il termine usato per descrivere il processo di divisione cellulare. Comprende in genere sei fasi: interfase, profase, metafase, anafase, telofase e citochinesi.

Controllo Positivo Omogeneo [CONTROL|+]: n. 2021 del catalogo. Fiala contagocce pronta all'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpi IgG specifici per DNA e/o antigeni nucleari DNP. Questo siero presenta una reazione con colorazione omogenea sul substrato cellulare HEp-2000®. La regione cromosomica delle cellule in mitosi presenta la stessa reazione con colorazione omogenea.

Controllo Positivo Maculato [CONTROL|+]: n. 2022 del catalogo. Fiala contagocce pronta all'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpi IgG specifici per Sm e/o antigeni nucleari RNP. Questo siero presenta la reazione "maculata tipica" sul substrato cellulare HEp-2000®. La regione cromosomica delle cellule mitotiche presenta una reazione negativa alla colorazione.

Controllo Positivo Nucleolare [CONTROL|+]: n. 2023 del catalogo. Fiala contagocce pronta all'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpi IgG specifici per antigeni nucleolari. Questo siero presenta una reazione nucleolare tipica sul substrato cellulare HEp-2000®.

Controllo Positivo Centromerico [CONTROL|+]: n. 2025 del catalogo. Fiala contagocce pronta all'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpi IgG specifici per centromeri cromosomici (cinetocore). La regione cromosomica delle cellule mitotiche presenta la stessa reazione maculata discreta.

Siero di Controllo Titolabile [TC]: n. 2026 del catalogo. Fiala pronta all'uso contenente 0,5 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpi IgG da trattare come campione del paziente, non diluito.

Siero di Controllo Negativo [CONTROL|-]: n. 2031 del catalogo. Flacone con contagocce contenente 1,0 ml. di siero umano negativo di controllo, pronto all'uso. Benché questo siero negativo di controllo possa manifestare una fluorescenza debole del citoplasma con colorazione più brillante della regione non-cromosomica delle cellule in mitosi, nessun pattern di colorazione nucleare risulta chiaramente discernibile.

Reagente anticorpale coniugato con fluoresceina [CONJ|FITC]: n. 2009-Ro (9,0 ml.), 2075-Ro (23,0 ml.) del catalogo. Siero anti-Globuline umane IgG di capra (catene pesanti e leggere) coniugato ad isotiocianato di fluoresceina (ITCF). Il Reagente è pronto per l'uso in flaconi con contagocce di precisione con 9,0 ml. per ogni 10 vetrini in kit completi. Per gli utenti che preferiscono un reagente anticorpo fluorescente specifico per IgG, numero di catalogo 2009CS (9.0 ml), 2009G-Ro (9.0 ml), 2009GCS-Ro (9.0 ml), 2075CS (23ml), 2075G-Ro (23ml), 2075GCS-Ro (23ml), 2009B (9,0 ml), 2075B (23 ml) sono disponibili. Contattare il rappresentante Immuno Concepts per informazioni sull'ordinazione.

COMPONENTI NON REATTIVI

Tampone PBS in polvere [PWDR|PBS]: n. 1011 del catalogo. Tampone fosfato-salino in polvere 0,01 M, pH 7,4 ± 0,2. Ciascuna bustina contiene il tampone in polvere sufficiente per fare 1 litro di soluzione. (Una bustina di tampone in polvere viene fornita in kit completi ogni cinque vetrini.)

Preparazione: sciogliere una bustina di polvere di tampone PBS in 1 litro d'acqua deionizzata o distillata, coprire e conservare tra i 2 e 25°C per un massimo di quattro settimane o fino alla comparsa di segni di contaminazione o altri cambiamenti visibili.

Liquido di montaggio semi-permanente [SOLN|MM]: n. 1111 del catalogo. Flacone con contagocce contenente 5,0 ml. di glicerolo-tamponato, pronto per l'uso.

Vetrini coprioggetto [CVSLP]: n. 1042 del catalogo. Ciascun pacchetto contiene dieci vetrini di vetro, 24 x 64 mm. Qualità n. 1.

MATERIALE AGGIUNTIVO SOLO SU RICHIESTA

Micropipette da 20 - 25 µl di capacità
Vaschette di Coplin o di colorazione
Spruzzetta e/o pipette Pasteur
Pipette graduate
Flacone da un litro (per tampone PBS)
Acqua deionizzata o distillata
Provette per allestire le diluizioni dei sieri

Piastra di Petri o altra camera d'incubazione
Carta da filtro e salviette di carta
Guanti monouso
Timer da Laboratorio
Microscopio in fluorescenza fornito di filtro d'eccitazione a 495 nm e filtro di sbarramento a 515 nm

PRECAUZIONI

1. Tutto il materiale d'origine umana utilizzato nella preparazione di questi kit è stato testato con metodiche approvate dalla FDA e risulta negativo (non ripetutamente reattivo) ad anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2, anticorpi contro il virus dell'epatite C e contro l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg).
Nessun metodo può però garantire in modo assoluto l'assenza dei virus HIV-1, HIV-2, delle epatiti C e B o di altri agenti infettivi. Di conseguenza, tutti i materiali all'interno dei kit devono essere manipolati con le stesse precauzioni usate per materiali potenzialmente infettivi.
2. Tutti i campioni prelevati da pazienti devono essere manipolati secondo il livello di biosicurezza 2 come si raccomanda per qualsiasi siero o campione di sangue umano potenzialmente infetto nei centri per il controllo delle malattie o nel Manuale degli Istituti Sanitari Nazionali: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. La diluizione o la sostituzione dei componenti con altri di diversa origine può produrre risultati inaffidabili.
4. L'azide di sodio diluita allo 0.09% è usata come conservante. L'azide di sodio può reagire con tubature in piombo o rame formandoli d'azide esplosivi. Nell'eliminare reagenti lasciare scorrere molta acqua dal rubinetto per evitare un ristagno di residui nelle tubature. L'azide di sodio è un veleno e può essere tossica se ingerita.
5. Questo kit deve essere usato solo per uso diagnostico *in vitro*.
6. Qualora si dovesse usare del siero emolizzato o lipoideo, disattivare al calore il siero per 30 minuti a 56°C per ottenere risultati ottimali. Il siero contaminato con elevata carica microbica non dev'essere usato.
7. L'uso del siero di controllo titolabile serve per verificare la riproducibilità lotto per lotto o serie per serie. Non è corretto il suo uso per la valutazione della sensibilità complessiva o la specificità del test.
8. Non fumare, mangiare né bere in aree dove sono manipolati campioni o reagenti del kit.
9. Evitare schizzi o formazione d'aerosol durante l'esecuzione dei tests.
10. Tempi d'incubazione e temperature diverse da quelle specificate possono dare risultati errati.
11. Contaminazioni crociate tra reagenti o campioni possono generare risultati inattendibili.
12. La strumentazione in vetro riutilizzabile dev'essere lavata a fondo e sciacquata accuratamente prima dell'uso. Inoltre dev'essere pulita ed asciutta prima dell'uso.
13. Portare tutti i reagenti, vetrini e campioni a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso.
14. Indossare guanti monouso quando si maneggiano campioni e reagenti e lavarsi accuratamente le mani al termine del lavoro.
15. La contaminazione microbica dei reagenti e dei campioni può dare risultati errati.
16. Non pipettare mai con la bocca ed evitare il contatto di reagenti e campioni con la pelle e le mucose. In caso di contatto lavarsi subito con un sapone germicida e risciacquare con abbondante acqua.

LA RACCOLTA DEL CAMPIONE

La raccolta: il siero è il campione consigliato. Usare una siringa di raccolta sterile e sotto vuoto o qualsivoglia sistema di raccolta adatto per prelevare circa 5 ml. di sangue mediante una venopuntura in condizioni di asepsi. Lasciare coagulare a temperatura ambiente (18-25°C). Separare il siero dal coagulo mediante centrifugazione il più presto possibile per minimizzare l'emolisi.

Sostanze interferenti: se il siero esibisce un grado elevato d'emolisi o è marcatamente itterico o iper-lipemico o si rileva una crescita microbica, non deve essere usato perché queste condizioni possono causare risultati aberranti. I campioni torbidi devono essere resi limpidi prima del test mediante la centrifugazione.

Conservazione: il siero può essere conservato a 2-10°C fino ad una settimana. Se il suo uso viene ulteriormente ritardato, il siero deve essere congelato a -20°C. o a temperature inferiori. Non conservare sieri in frigoriferi o congelatori a sbrinamento automatico.

AVVERTENZA: ripetuti congelamenti e scongelamenti del campione di siero di pazienti possono dare risultati errati (falsi positivi o falsi negativi).

L'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

CONTROLLO DI QUALITÀ

I controlli positivo, negativo e del PBS devono essere eseguiti una sola volta per ogni prova. Il controllo positivo deve mostrare una fluorescenza brillante verde-mela nei nuclei cellulari, con un pattern chiaramente discernibile e caratteristico del siero di controllo usato. Il siero di controllo Negativo deve mostrare una debole fluorescenza verde citoplasmatica e nucleare, non-specifica e di bassa intensità, ma senza un pattern discernibile di colorazione nucleare. Il controllo del PBS è usato per osservare un'eventuale colorazione non-specifica da parte del reagente anticorpale e non deve presentare alcuna fluorescenza verde. Se i controlli non appaiono come descritto sopra, il test è nullo e deve essere ripetuto. I controlli dei cinque pattern dovrebbero essere eseguiti almeno una volta per ciascun lotto di kit, per dimostrare la prevista presenza dei pattern ANA. Se il test ANA HEp-2000® viene usato per confermare la presenza di anticorpi anti-SSA/Ro, il Controllo Positivo SSA/Ro, n. 2035-Ro del catalogo, deve essere effettuato su almeno uno dei vetrini del giorno.

CONTROLLO TITOLABILE FACOLTATIVO

Nella lettura dei titoli molti laboratori iniziano dal pozzetto che contiene il campione più diluito e procedono "all'inverso" nella valutazione fino a una diluizione di 1:40. Il primo pozzetto che presenta un pattern di colorazione nucleare chiaramente visibile e' il punto finale di titolazione. Consigliamo di seguire questa tecnica nella determinazione del punto finale di titolazione.

La titolazione media e la fascia dei valori di titolazione (\pm una diluizione su ciascun lato del valore medio) trovati per questo lotto furono stabiliti nel nostro laboratorio e vengono considerati una linea guida. Questo controllo viene fornito per permettere a ciascun laboratorio di valutare la riproducibilità (precisione) del suo test ANA. Dal momento che questo controllo non intende essere un indicatore della precisione della titolazione, ciascun laboratorio dovrebbe stabilire il proprio punto finale medio di titolazione per questo campione e dovrebbe far uso di questa informazione per valutare la riproducibilità (precisione) serie per serie.

Attraverso prove ripetute di questo controllo titolabile mediante l'uso del test ANA in immunofluorescenza indiretta è stato stabilito un valore medio di titolazione per ciascun lotto. Il numero del lotto, la titolazione media e la fascia della titolazione (\pm una diluizione doppia su ciascun lato del valore medio) sono stampati sull'etichetta del flacone e dovrebbero fungere da linea guida nella valutazione del test.

E' importante che l'intensità della fluorescenza non venga confusa con la presenza o l'assenza di anticorpi antinucleari. L'elemento chiave da tener presente quando si determina se una data soluzione di siero è positiva è l'aspetto di un pattern di colorazione chiaramente discernibile, a prescindere dall'intensità della colorazione in fluorescenza. Questo controllo titolabile dimostrerà il tipico pattern di colorazione maculata associata con l'anticorpo RNP. Può anche essere presente un secondo pattern di MND I (numerose macule discrete nel nucleo di cellule in interfase), è però il tipico pattern maculato RNP che deve essere usato per leggere il punto finale di titolazione.

I valori ottenuti nel nostro laboratorio potrebbero essere diversi dai vostri. Alcuni fra i molti fattori che possono influenzare i vostri risultati possono anche comprendere:

1. La fonte di luce usata. Fonti di luce al mercurio produrranno una maggiore energia d'eccitazione a 495 nm rispetto a quelle al quarzo o a quelle alogene. Le fonti di luce al mercurio da 50-watt, 100-watt e 200-watt differiscono poco per quanto riguarda l'energia d'eccitazione a 495 nm. Le fonti di luce al quarzo o quelle alogene da 100-watt produrranno una maggior energia d'eccitazione a 495 nm rispetto a quelle al quarzo o a quelle alogene da 50-watt.
2. La condizione e l'età della fonte di luce. Questo è particolarmente vero per le fonti di luce al mercurio che di solito diminuiscono in modo graduale l'energia d'eccitazione a 495 nm prima di spegnersi. Questo graduale calo nell'energia d'eccitazione può provocare una significativa perdita di sensibilità per varie settimane. Si può evitare questo problema mantenendo un registro del tempo. Per risultati ottimali sostituire le lampadine al mercurio da 50-watt dopo 100 ore d'uso e quelle da 100 o 200-watt dopo 200 ore d'uso. Le fonti di luce al quarzo o quelle alogene non presentano generalmente una riduzione dell'energia d'eccitazione prima di spegnersi.
3. Il tipo di filtro d'eccitazione usato. Filtri d'eccitazione ad interferenza forniscono una maggior sensibilità in una lunghezza d'onda molto più stretta rispetto ai filtri d'eccitazione ad assorbimento. Consultate il manuale del vostro microscopio a fluorescenza o il vostro rivenditore per ulteriori informazioni.
4. Un corretto allineamento del raggio di luce del microscopio. Consultate il manuale del vostro microscopio a fluorescenza per avere istruzioni.

5. L'apertura numerica dell'obiettivo. Con luce fluorescente incidente (Epi), la fluorescenza aumenta esponenzialmente con l'aumentare dell'apertura numerica (AN) dell'obiettivo. Questo può portare un obiettivo 40X con AN di 0.65 a leggere una o più diluizioni in meno rispetto all'obiettivo 40X con un'AN di 0.85. L'apertura numerica è stampata sul fianco dell'obiettivo. La sensibilità della microscopia a luce fluorescente trasmessa non è condizionata dall'AN.
6. Filtri di soppressione. I filtri di soppressione diminuiscono le lunghezze d'onda specifiche d'eccitazione e si possono usare per ridurre la sensibilità. Consultate il manuale del vostro microscopio a fluorescenza o il rivenditore per ulteriori informazioni.
7. La precisione e l'esattezza della tecnica di diluizione, la strumentazione e l'esecuzione delle procedure del test.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL PAZIENTE

Si raccomanda di leggere i vetrini una prima volta con ingrandimento totale 200X per eseguire lo screening visivo di positività e/o negatività dei campioni e per determinare il punto finale di titolazione, per poi passare ad un ingrandimento totale di 400X per eseguire il riconoscimento del pattern specifico e l'osservazione delle cellule mitotiche.

Negativo: un siero è considerato negativo per anticorpi antinucleari se la colorazione nucleare è meno intensa o uguale al pozzetto di controllo negativo e non presenta un pattern chiaramente discernibile. Il citoplasma può mostrare una colorazione debole, con una colorazione più brillante della regione non-cromosomica delle cellule mitotiche, ma senza manifestare un pattern nucleare chiaramente discernibile.

Positivo: un siero è considerato positivo se il nucleo della maggior parte delle cellule in interfase dimostra un pattern di colorazione chiaramente discernibile.

SSA/Ro: un siero viene ritenuto positivo verso anticorpi SSA/Ro se il 10-20% dei nuclei in interfase dimostra il tipico pattern di colorazione SSA/Ro, che si manifesta come un pattern chiaro, brillante e maculato con un'evidente colorazione dei nucleoli. Questi rappresentano la sovraespressione delle cellule transfettate. Il restante 80-90% di nuclei in interfase può o meno mostrare una colorazione nucleare finemente maculata con o senza effettuare la colorazione in immunofluorescenza dei nucleoli.

Titolazione: nella lettura del titolo si raccomanda di iniziare dal pozzetto che contiene il campione più diluito e di procedere all'inverso fino al pozzetto con la diluizione 1:40. Il primo pozzetto che presenta un pattern chiaramente discernibile è il punto finale della titolazione. Noi consigliamo questa tecnica per la determinazione del punto finale della titolazione. È importante che l'intensità di colorazione non sia confusa con la presenza o assenza d'anticorpi antinucleari. L'elemento fondamentale da tenere in mente quando si determina se una data diluizione del siero è positiva è la comparsa o meno di una colorazione che per prima evidenza un pattern nucleare specifico chiaramente discernibile, a prescindere dall'intensità della colorazione. A causa dell'aumentata concentrazione dell'antigene SSA/Ro nella sovraespressione delle cellule, può capitare di notare la colorazione di queste cellule ad una titolazione molto alta. Non è ancora noto il significato clinico di questi titoli alti.

AVVERTENZA: alcuni sieri possono mostrare una colorazione nucleare e citoplasmatica senza un pattern nucleare discernibile. Questo fenomeno è generalmente dovuto ad anticorpi eterofili e deve essere registrato come negativo (33).

L'INTENSITÀ DELLA FLUORESCENZA

L'intensità della fluorescenza degli antisieri fluorescenti può essere semi-quantificata seguendo le direttive del Centro per il Controllo e la Prevenzione delle Malattie, Atlanta, Georgia (USA).

- 4+ Fluorescenza Brillante giallo-verde (fluorescenza massima): contorni ben definiti; ottima e nitida definizione del centro delle cellule.
- 3+ Fluorescenza giallo-verde meno brillante: contorni ben definiti; ottima definizione del centro delle cellule.
- 2+ Fluorescenza fioca, buona definizione del pattern cellulare: contorni meno evidenti.
- 1+ Fluorescenza molto bassa: contorni delle cellule pressoché indistinguibili dai costituenti nucleari, nella maggior parte dei casi.

Per la determinazione dell'intensità della fluorescenza è disponibile un vetrino di riferimento, il FITC QC Slide™, realizzato dalla Immuno Concepts N.A. L'ide indicato a catalogo al codice #1900.

REFERTAZIONE DEI RISULTATI

Screening: i risultati dovrebbero essere refertati come positivi o negativi alla diluizione 1:40, seguiti dal tipo di pattern di colorazione nucleare per i campioni positivi.

Titolazione: i risultati dovrebbero essere riportati citando il rapporto di diluizione maggiore nel quale è stato evidenziato il pattern specifico. Risultati con elevata reattività alla più alta diluizione dovrebbero essere riportati come superiori a quella diluizione. Titoli da 1:40 a 1:80 sono da considerarsi positivi a bassotitolo. Titoli da 1:160 a 1:320 sono da considerarsi positivi a titolo medio. Titoli da 1:640 e superiori sono da considerarsi positivi a titolo elevato. 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.

DEFINIZIONE DEI PATTERN

Omogeneo: Una colorazione molto evidente del nucleo che può anche celare i nucleoli. L'area cromosomica di cellule mitotiche in interfase è palesemente positiva e l'intensità della colorazione omogenea o periferica è maggiore o uguale a nuclei in interfase.

Sinonimi: diffuso, omogeneo

Antigeni nucleari: dsDNA; nDNA; DNP e istoni.

Malattie associate: titoli alti suggeriscono la presenza di LES. Titoli bassi possono suggerire LES o altre patologie del tessuto connettivo (34).

Periferico: Si tratta di una fluorescenza omogenea con netto rinforzo alla periferia del nucleo e una colorazione meno intensa verso il centro del nucleo. Le regioni cromosomiche delle cellule in mitosi in metafase appaiono anch'esse palesemente positive con un'intensità di colorazione omogenea o periferica maggiore o uguale a quella dei nuclei in interfase.

Sinonimi: bordo, villosa, membranosa.

Antigeni nucleari: dsDNA, ssDNA, nDNA, DNP e istoni.

Malattie associate: titoli alti suggeriscono la presenza di LES, mentre titoli bassi possono suggerire LES o altre malattie del tessuto connettivo (34).

Maculato: Si tratta di una colorazione granulare grossolana o fine del nucleo in genere senza la colorazione fluorescente dei nucleoli.

La regione non cromosomica delle cellule mitotiche in metafase risulta positiva alla colorazione mentre la regione cromosomica risulta negativa.

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

Malattie associate: alti titoli possono suggerire LES (antigene Sm), patologie combinate del tessuto connettivo (antigene RNP), sclerodermia (antigene Scl-70) o la sindrome di Sjögren (antigene SSA/Ro o SSB/La). Titoli bassi possono invece suggerire altre patologie del tessuto connettivo (35).

Nucleolare: Si tratta di una colorazione a macule grandi e grossolane all'interno del nucleo, in genere meno di 6 per cellula, con eventuali macule fini, da 5 a 10. La regione non cromosomica delle cellule mitotiche in metafase presenta una colorazione forte mentre l'area cromosomica potrebbe manifestare una colorazione fiavola. Le cellule in anafase e telofase manifestano colorazione simile a quelle in interfase.

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

Malattie associate: alti titoli sono prevalenti nella sclerodermia e nella Sindrome di Sjögren (36).

Centromerico: Il quadro presenta una colorazione a macule discrete molto indicativo del CREST[§], variante della Sindrome di sclerosi progressiva sistemica (28). Le macule nucleari sono molto discrete e sono di solito un multiplo di 46, con in genere da 23 a 46 macule per nucleo. Essendo i centromeri dei restringimenti dove le fibre fusiformi si legano ai cromosomi, le cellule mitotiche mostrano la stessa reazione maculare nella zona cromosomica (12).

Sinonimi: ACA; macule discrete.

Antigeni nucleari: centromeri cromosomici (cinetocore).

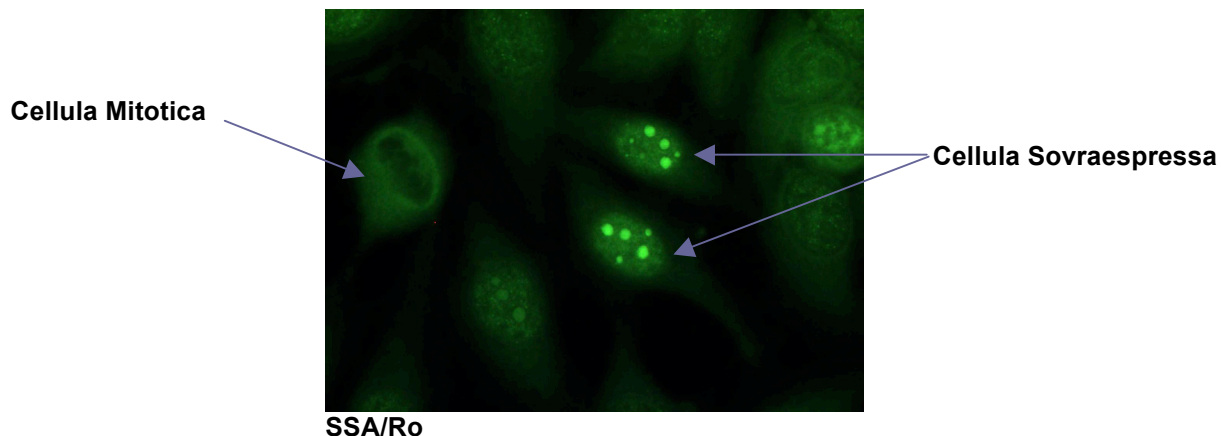
Malattie associate: molto suggestivo del CREST variante della Sindrome di sclerosi progressiva sistemica (28).

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

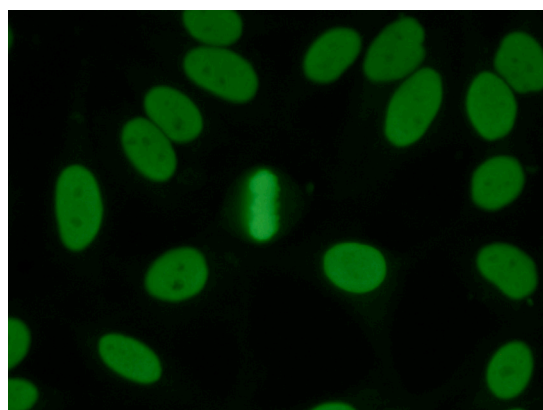
SSA/Ro: Si tratta di un pattern maculato chiaro luminoso con colorazione prevalente dei nucleoli nel 10-20% dei nuclei delle cellule in interfase. Queste sono le cellule transfettate che sovraesprimono l'antigene originario. Il rimanente 80-90% delle cellule in interfase può o non può mostrare una colorazione finemente maculata dei nuclei con o senza colorazione fluorescente dei nucleoli. La zona non-cromosomica delle cellule mitotiche in metafase mostra la colorazione, mentre la regione cromosomica risulta negativa.

Antigeni nucleari: SSA/Ro (60kD).

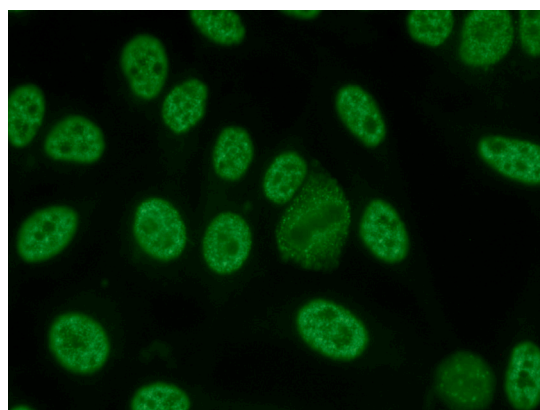
Malattie associate: alti titoli nel 60-70% di pazienti con la Sindrome di Sjögren primaria, nel 30-40% dei pazienti con LES e maggiore del 95% nei pazienti con LES subacuto cutaneo (37).



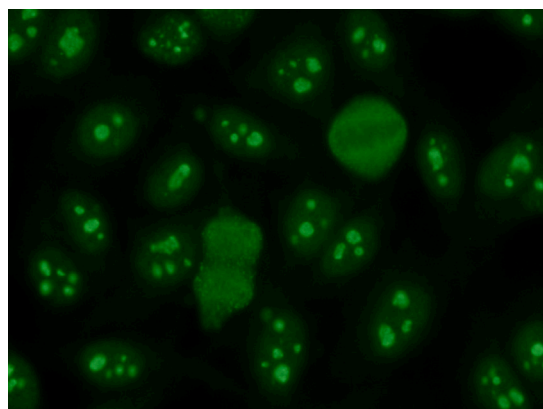
PATTERN BASILIARA DELLA COLORAZIONE



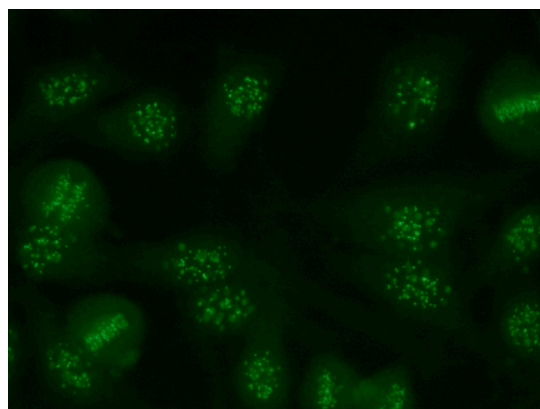
Omogeneo



Punteggiato



Nucleolare



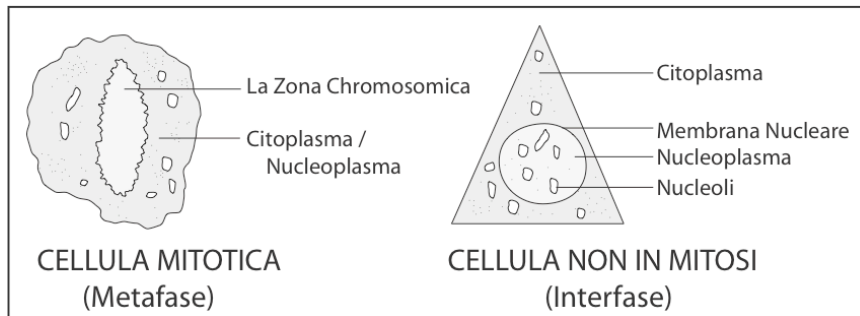
Centromero

CELLULE MITOTICHE

RILEVAMENTO

Le cellule mitotiche devono essere visibili in ogni campo se osservate a 200 ingrandimenti o meno. Per verificare se una cellula è in mitosi, passare a 400X. Le cellule mitotiche mostrano una caratteristica forma tondeggiante senza un'evidente membrana nucleare. La zona cromosomica delle cellule mitotiche mostra una forma irregolare, dovuta alla mancanza della membrana nucleare, e la condensazione estrema dei cromosomi.

Il siero positivo per anticorpi anti n-DNA e/o DNP e/o istoni (come il controllo positivo omogeneo della Immuno Concepts) mostrerà una colorazione brillante della regione cromosomica di queste cellule. In campioni negativi per n-DNA e/o DNP e /o istoni (come il controllo positivo maculato della Immuno Concepts), le cellule mitotiche non assumono alcuna colorazione in zona cromosomica e sono inoltre di difficoltosa visualizzazione.



USO DELLE CELLULE MITOTICHE

Differenziazione tra anticorpo maculato (speckled) e omogeneo: la colorazione di un pattern finemente maculato è talvolta difficile da differenziare da una colorazione con pattern omogeneo.

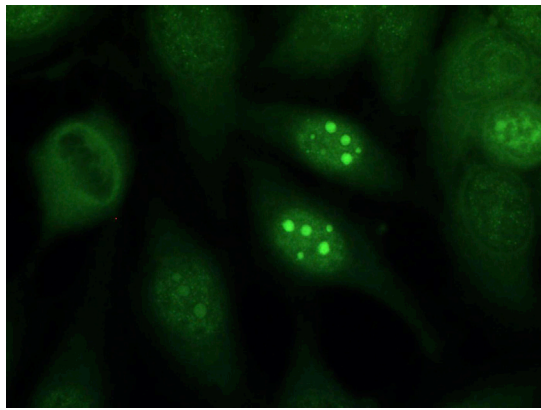
Se il pattern è omogeneo, ci sarà una colorazione diffusa dei cromosomi delle cellule mitotiche. Se il pattern è solo maculato la regione esterna ai cromosomi mostrerà una reazione finemente maculata.

NOTA: se si verifica una colorazione finemente maculata dell'intera cellula mitotica insieme ad una colorazione diffusa della zona cromosomica, è molto probabile che siano presenti due o più anticorpi. Riportare la diluizione dello screening come maculato/omogeneo, poi titolare ciascun anticorpo fino al punto finale di titolazione.

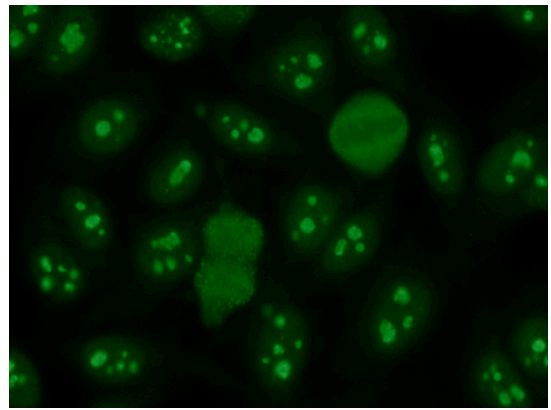
Differenziazione tra ANA periferico e ANA membrana nucleare: ad un pattern periferico sono associati generalmente anticorpi diretti contro gli antigeni nucleari DNA/DNP. Alti titoli di questi anticorpi sono indicativi di LES. Nei substrati che non contengono cellule in mitosi, il pattern periferico è difficile da distinguere dall'anticorpo anti-membrana nucleare. Se si utilizzano invece substrati cellulari mitotici della Immuno Concepts, questi patterns possono essere differenziati, perché la zona cromosomica delle cellule mitotiche appare colorata intensamente in un pattern periferico, al contrario sarà negativa alla colorazione con anticorpi anti-membrana nucleare. Questa distinzione è clinicamente importante perché gli anticorpi anti-membrana nucleare non sono DNA/DNP specifici e non sono associati al LES (38).

Anti-centromero (ACA) vs maculato atipico centromero simile: per verificare gli ACA, la regione cromosomica delle cellule mitotiche dovrebbe presentare una colorazione brillante con discrete macule. Se invece la regione cromosomica risulta negativa alla colorazione, l'anticorpo probabilmente non è anti-centromero e si dovrebbe registrare come "maculato atipico".

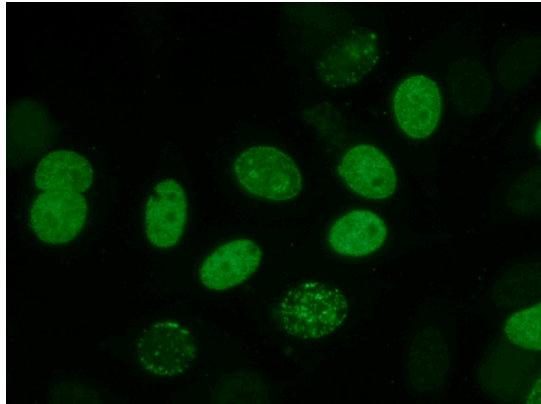
SSA/Ro vs patterns che potrebbero assomigliare alla colorazione con SSA/Ro: la tipica colorazione SSA/Ro si presenta come un pattern nitido e brillante con predominante colorazione dei nucleoli nel 10-20% dei nuclei in interfase. Il restante 80-90% dei nuclei in interfase può dimostrare o meno una colorazione finemente maculata del nucleo con o senza la colorazione fluorescente dei nucleoli. La zona cromosomica delle cellule mitotiche in metafase risulta negativa alla colorazione. Il pattern nucleolare può essere differenziato grazie ad una colorazione a grandi macule grossolane in tutti i nuclei, in genere meno di 6 per cellula. Il pattern Scl-70 dimostra una colorazione finemente maculata, la colorazione nucleolare in tutti i nuclei in interfase e la colorazione della regione cromosomica delle cellule mitotiche in metafase. Gli anticorpi contro l'antigene nucleare di cellule proliferative (PCNA) dimostrano macule fini e grossolane variabili nel 30-50% dei nuclei in interfase.



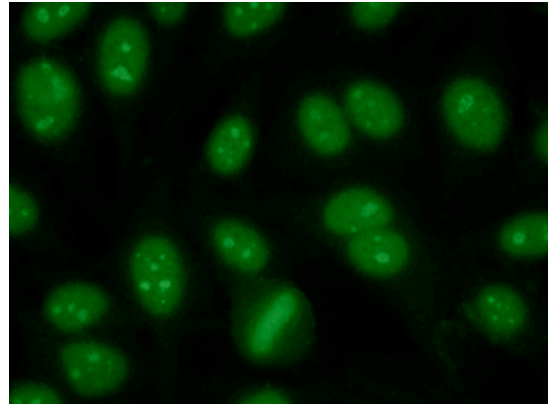
SSA/Ro



Nucleolare



PCNA



Scl-70

FLUORESCENZA CITOPLOSMICA

Sebbene gli autoanticorpi verso antigeni citoplasmatici non siano comunemente associati con malattie del tessuto connettivo, questi anticorpi possono essere scoperti usando come substrati colture cellulari epiteliali (40). Gli anticorpi antimitocondriali e quelli contro la muscolatura liscia sono quelli più comunemente rilevati e sono associati generalmente con la mononucleosi, epatite cronica attiva e malattie epatiche (41-42). Usando le HEP-2 come substrato, la presenza dell'anticorpo contro la muscolatura liscia è stata dimostrata anche in pazienti con verruche (43).

Anticorpo anti mitocondriale (AMA): macule discrete i sono concentrate nella regione perinucleare della cellula e si estendono con minor intensità nelle regioni esterne del citoplasma. Questo dovrebbe essere distinto dagli anticorpi anti-Golgi, che generalmente si colorano solo da un lato della regione perinucleare, e dagli anticorpi anti-ribosomiali, i quali manifestano macule fini con aspetto filiforme congruo con la posizione del reticolo endoplasmico nelle cellule (50).

NOTA: le macule perinucleari possono essere più facilmente distinte dalla colorazione nucleare periferica osservando che mentre le macule da positività mitocondriale formano una banda discontinua attorno alla faccia esterna della membrana nucleare, i sieri periferici mostrano una più diffusa colorazione sulla faccia interna della membrana nucleare.

REFERTARE IL SIERO COME NEGATIVO PER ANTICORPI ANTI NUCLEARI E VERIFICARE LA POSITIVITÀ PER GLI ANTICORPI ANTI MITOCONDRIALI SU SUBSTRATO AMA SPECIFICO.

Anticorpo anti-muscolatura liscia (ASMA): colorazione molto bella e fibrosa con aspetto a tela di ragno nell'intero citoplasma. A differenza dell'anticorpo anti- mitocondriale, l'anticorpo anti-muscolatura liscia marca in modo uniforme l'intero citoplasma e si può diffondere anche al nucleo. Le cellule mitotiche generalmente mostrano grosse macule discrete al di fuori della regione cromosomica (50). L'anticorpo anti-muscolatura liscia mostra un'elevata specificità per l'actina. (44-45).

REFERTARE IL SIERO COME NEGATIVO PER L'ANTICORPO ANTI-NUCLEARE E VERIFICARE LA POSITIVITÀ PER L'ANTICORPO ANTI-MUSCOLATURA LISCIA SU SUBSTRATO ASMA SPECIFICO.

LE LIMITAZIONI DEL TEST

1. La diagnosi non può essere fatta solamente sulla base di una rivelazione dell'anticorpo antinucleare. Il medico deve interpretare i risultati in combinazione con la storia e la sintomatologia dei pazienti l'esame obiettivo e altre procedure diagnostiche.
2. Una cura non dovrebbe essere iniziata sulla sola base di un test positivo per anticorpi antinucleari. Le indicazioni cliniche, altri risultati di laboratorio e l'impressione clinica del medico devono essere considerati prima di iniziare qualunque trattamento.
3. Qualche farmaco, come la procainamide e l'idralazina, può indurre una malattia lupus eritematoso simile (46). Pazienti con LES indotto da farmaci possono mostrare ANA positivo omogeneo od omogeneo/periferico comunemente diretti contro istoni nucleari (47).
4. Una percentuale piccola di pazienti con LES può non dimostrare ANA con immunofluorescenza indiretta, ma può avere positività ANA con altri metodi (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 alto titolo ANA può essere considerato molto indicativo di malattia del tessuto connettivo, non dovrebbe essere considerato come diagnostico ma piuttosto come una parte della storia clinica globale di un paziente.
6. I patterns della colorazione spesso cambiano con la titolazione progressiva del siero. Questo fenomeno è generalmente causato dalla presenza di più di un anticorpo nucleare.
7. A causa delle molte opzioni disponibili sui microscopi a fluorescenza, è raccomandato l'uso di sorgenti di luce, filtri ed ottiche standardizzate quando si paragonano i titoli dei pazienti e quelli di laboratori.
8. ANA positivi sono visti anche in una percentuale piccola di pazienti con malattie infettive e/o neoplastiche (9).
9. Autoanticorpi contro SSA/Ro dimostrano un tipico pattern di colorazione nelle cellule transfettate. Quando tale pattern è presente, lo si ritiene una prova evidente della presenza di anticorpi anti-SSA/Ro. L'assenza di questo pattern non assicura la totale assenza di eventuali anticorpi anti-SSA/Ro.
10. A causa della sovraespressione dell'autoantigene SSA/Ro nelle cellule HEp-2000[®], i campioni che contengono anticorpi anti-SSA/Ro presentano titoli più alti in queste cellule rispetto ai valori ottenuti in cellule HEp-2 non transfettate. Dal momento che nessuno degli altri autoantigeni persenti sulle cellule HEp-2000[®] è condizionato dal processo di transfezione, sieri che presentano altre specificità autoanticorpali non dimostrano una significativa differenza nella titolazione fra la linea cellulare HEp-2000[®] transfettata e le cellule HEp-2 non transfettate.

VALORI ATTESI

In una valutazione clinica eseguita in un Laboratorio di riferimento presso una clinica universitaria statunitense, usando substrati HEp-2 ed HEp-2000 per ANA, si sono ottenuti i seguenti dati in un periodo di due anni (49).

Tavola 1.

TAVOLA 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

INTERVALLO DI RIFERIMENTO

L'intervallo di riferimento per il rilevamento di anticorpi antinucleari nella popolazione normale è "Negativo". Come mostrato nella Tabella sopra, una piccola percentuale di individui normali mostrerà un ANA positivo. Ciascun laboratorio dovrebbe stabilire e attenersi ai propri valori di riferimento (normali), basandosi sulla popolazione di pazienti e altri fattori locali.

PRESTAZIONALI DEL TEST

CAMPIONI NORMALI

I sieri di 500 donatori di sangue sani, 242 donne e 258 maschi, nessuno dei quali abbia presentato alcuna storia nota di malattia reumatica, sono stati testati in parallelo usando cellule HEp-2 reperibili commercialmente non transfettate e cellule HEp-2000[®] del test ANA-Ro in fluorescenza. In questa popolazione 36 campioni (7,2%) hanno mostrato positività all'anticorpo antinucleo alla diluizione di 1:40. Per 34 dei 36 campioni il pattern di colorazione era uguale con i due substrati. I due restanti campioni provenivano entrambi da soggetti di sesso femminile ed ambedue hanno confermato di contenere anticorpi anti-SSA/Ro. Uno di questi campioni ha mostrato una debole presenza di macule con le cellule HEp-2 non transfettate e la tipica colorazione "SSA/Ro" sulle cellule HEp-2000[®] del test in fluorescenza ANA-Ro. L'altro campione era negativo sulle cellule HEp-2, ma ha mostrato la tipica colorazione "SSA/Ro" sulle cellule HEp-2000[®] del test in fluorescenza ANA-Ro. La specificità SSA/Ro di questi due campioni è stata confermata con il test ELISA e con Western immunoblotting.

SIERI DA PAZIENTI CON SOLO TITOLI ANTICORPALI SSA/Ro

I sieri di 46 pazienti con LES o malattia di Sjögren sono stati testati usando cellule HEp-2 non transfettate commercialmente reperibili e cellule HEp-2000[®] dell'ANA-Ro Test. Tutti questi sieri hanno confermato di contenere anticorpi contro l'autoantigene SSA/Ro con il test ELISA e con Western immunoblotting. In nessun campione sono stati trovati altri autoanticorpi. 36 di questi campioni (78%) erano positivi (pattern maculato) con le cellule HEp-2 non transfettate e tutti i 46 (100%) erano positivi (colorazione specifica SSA/Ro) con le cellule HEp-2000[®] del test in fluorescenza ANA-Ro.

SIERI DA PAZIENTI CON ALTRI AUTOANTICORPI DIVERSI DA SSA/Ro

Campioni di siero di 230 pazienti con una varietà di malattie reumatiche e non sono stati testati in parallelo usando cellule HEp-2 non transfettate reperibili commercialmente e cellule HEp-2000[®] dell'ANA-Ro Test. Un singolo pattern di colorazione è stato visto in 120 campioni e pattern misti in 110 campioni. Su una popolazione totale di 230 campioni, 333 pattern di colorazione erano identici in ambedue i substrati, 29 campioni hanno mostrato il distintivo pattern SSA/Ro sulle cellule HEp-2000[®]. 23 di questi campioni hanno mostrato un pattern maculato sulle cellule HEp-2.

I 6 campioni divergenti (positivi all'HEp-2000[®], ma negativi sulle HEp-2) avevano tutti autoanticorpi SSA/Ro come dimostrato dal pattern distintivo di colorazione SSA/Ro, confermato dal test ELISA e dal Western Blotting.

COMPARAZIONE DEI TITOLI

A causa dell'autoantigene SSA/Ro nelle cellule HEp-2000[®], i campioni che contengono anticorpi anti-SSA/Ro mostrano valori di titolo più alto su queste cellule rispetto a quelli ottenuti sulle cellule HEp-2 non transfettate. Poiché nessun altro autoantigene nelle cellule HEp-2 è transfettato, i sieri con altre specificità anticorpali non mostrano differenze significative di titolo tra le cellule transfettate e le non transfettate.

RIPRODUCIBILITÀ DEL TITOLO

Dieci campioni, scelti tra controlli dei centri per il controllo delle malattie e altri sieri ben caratterizzati in sede, sono stati testati su tre differenti numeri di lotto di vetrini con cellule HEp-2000[®] in tre differenti occasioni. In nessun caso un campione negativo ha dato risultato positivo. Tutti i valori di titolo erano entro la diluizione di due volte rispetto al valore di titolo medio stabilito per tutti i campioni testati.

ACCERTAMENTO DI ANTICORPI SSA/Ro

In un laboratorio di riferimento di rilievo, campioni di siero prelevati da 349 pazienti con accertata positività al test ANA furono saggiati con il test ANA ad immunofluorescenza indiretta con cellule HEp-2000[®]. In questa popolazione scelta, 239 campioni dimostrarono il tipico pattern di colorazione SSA/Ro. Test ELISA positivi per anticorpi SSA/Ro furono ottenuti in 238 (99,6%) di questi campioni. Altri 79 campioni dimostrarono pattern omogenei o a forti macule e diedero dei test ELISA positivi per gli anticorpi SSA/Ro. Quindi, se si osserva il pattern tipico del SSA/Ro, si conferma la presenza di anticorpi SSA/Ro, ma l'assenza di questo pattern non assicura la totale assenza di eventuali anticorpi SSA/Ro. Negli studi sopra descritti abbiamo studiato un totale di 429 sieri contenenti anticorpi SSA/Ro come fu confermato dal test ELISA e Western Immunoblotting, i quali dimostrarono il pattern di colorazione tipico del SSA/Ro sulle cellule transfettate HEp-2000[®].

Abbiamo anche visto campioni che contengono anticorpi SSA/Ro, ma non presentano il caratteristico pattern di colorazione SSA/Ro, perché alte concentrazioni di altri autoanticorpi (in genere anticorpi anti-DNA o anti-Sm/RNP) mascherano il pattern SSA/Ro. Quindi, quando si visualizza il tipico pattern SSA/Ro, si conferma la presenza di anticorpi SSA/Ro, ma l'assenza di questo pattern non assicura la totale assenza di eventuali anticorpi SSA/Ro.

UTILIZZO CON IMAGE NAVIGATOR®

Image Navigator® è un sistema con microscopio semiautomatico di Immuno Concepts per la lettura dei vetrini a fluorescenza ANA HEp-2000®. In un confronto tra Image Navigator® e la lettura convenzionale dei vetrini a fluorescenza ANA, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Concordanza positiva, 99,8%; concordanza negativa, 98,9%; concordanza complessiva, 99,4% (n = 739 campioni).

La sensibilità clinica per il rilevamento di ANA nei pazienti con lupus eritematoso sistemico accertato è stata del 93,8% con le letture convenzionali, e del 94,1% con Image Navigator®. Nei 301 pazienti con patologie dei tessuti connettivi accertate, la sensibilità clinica è stata dell'82,7% con le letture convenzionali, e dell'83,1% con Image Navigator®.

In un gruppo di 296 pazienti con patologie diverse da quelle dei tessuti connettivi e 142 individui di controllo sani (n totale = 438), la specificità clinica è stata dell'87,3% con le letture convenzionali e dell'87,4% con Image Navigator®.

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 (Scl-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *Biol. Chem.* 245:10514 - 10522, 1979.
12. 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.
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 SS-A/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/SS-A 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., Fritzier, 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., Fritzier, M. J. Antibody to Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics and Cytological Studies. *J. Rheum.* 11:213-218, 1984.
32. Weiler, 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.
33. Peter, V.B., Dawkins, R. L. Evaluating Autoimmune Disease. *Diagnostic Medicine.* Sept. - Oct. 1979.
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. Antinuclear 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. Fritzier, 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.
50. McCarty, G.A., Valencia, D.W., Fritzler, M. J. Antinuclear Antibodies: Contemporary Techniques and Clinical Application to Connective Tissue Diseases. New York, Oxford University Press, 1984.

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



Solo Rx - Solo su prescrizione medica

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-Ro-I,

4.11.02.003.091-It

Rev 4.4 © Copyright 2021

PROCEDURA DI ANALISI IN FLUORESCENZA DEGLI ANA-RO

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 bustina di PBS in 1 litro d'acqua deionizzata o distillata. Il tampone PBS può essere sigillato e conservato a 2-25°C fino ad un massimo di quattro settimane.
- 2. DILUIRE I CAMPIONI**
Screening: Diluire i campioni fino a 1:40 aggiungendo 0,05 ml. (50 µl.) di siero ad 1,95 ml. di PBS ricostituito. *
Titolazione semi-quantitativa: preparare diluizioni scalari dei campioni da testare con PBS (es. 1:80, 1:160, 1:320,...etc.).
- 3. PREPARARE I VETRINI DI SUBSTRATO** (pozzetti da 15 - 20 µl.)
Togliere il/i vetrino/i dalle bustine e immettere il siero di controllo nei pozzetti di controllo secondo le indicazioni: capovolgere il flacone con contagocce e premere dolcemente finché non comparirà una goccia sulla punta. Appoggiare dolcemente la goccia nel pozzetto di controllo specifico, evitando il contatto diretto fra la punta del contagocce e la superficie del vetrino. Applicare una goccia (15-20 µl) dei sieri dei pazienti da testare su ciascun pozzetto numerato.
NOTA: per effettuare uno screening generale si consiglia il controllo positivo omogeneo. Per quanto riguarda la titolazione semi-quantitativa, il Controllo titolabile, numero di catalogo 2026, dovrebbe essere eseguito per ciascun lotto di campioni dei pazienti. Tutti i controlli dei pattern dovrebbero essere eseguiti per ciascun numero di lotto di kit, per dimostrare la prevista presenza dei pattern ANA. 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.
AVVERTENZA: il contatto diretto fra la punta del contagocce e la superficie del vetrino può danneggiare il substrato antigenico.
- 4. INCUBARE I VETRINI** (30 ± 5 minuti a temperatura ambiente, es. 18-25°C)
Mettere il/i vetrino/i in una camera umida (una piastra di Petri con salviette inumidite sul fondo può andar bene). Applicare il coperchio e incubare per 30 minuti (± 5 minuti) a temperatura ambiente (18-25°C).
- 5. RISCIAQUARE CON PBS**
Al termine dell'incubazione togliere i vetrini dalla camera umida e sciacquare brevemente con PBS usando la spruzzetta, le pipette Pasteur o quelle graduate. Non dirigere il getto direttamente sui pozzetti.
- 6. LAVAGGIO IN PBS** (10 minuti)
Immergere i vetrini per 10 minuti in una vaschetta di colorazione o di Coplin contenente PBS. Questo lavaggio può essere prolungato per 10 - 30 minuti senza variazione alcuna nei risultati finali del test. Dopo l'uso gettare la soluzione di lavaggio PBS.
- 7. APPLICARE L'ANTISIERO CONIUGATO CON ITCF** (coprire i pozzetti con 12-14 gocce)
Togliere un vetrino per volta dal PBS e immergerlo 3 - 5 volte in acqua deionizzata o distillata. Scuotere leggermente il vetrino su carta assorbente o salviette per rimuovere l'acqua in eccesso. Rimettere immediatamente il vetrino nella camera d'incubazione e coprire completamente i pozzetti con il reagente anticorpale fluorescente. Iniziare applicando una goccia su ciascun pozzetto. Ripetere l'operazione per ciascun vetrino. L'anticorpo fluorescente è titolato per compensare il residuo d'acqua deionizzata o distillata rimasta sui pozzetti dopo il risciacquo.
NOTA: è importante che i pozzetti dei vetrini non si asciughino durante questa fase, per evitare danni al substrato.
NON ASCIUGARE CON CARTA DA FILTRO O LASCIAR SECCARE I VETRINI IN ALCUN MODO. NON LASCIARE ALL'ARIA SENZA CONIUGATO ITCF PER PIÙ DI 15 SECONDI.
- 8. INCUBARE I VETRINI** (30 ± 5 minuti a temperatura ambiente, es. 18-25°C)
Posizionare il coperchio sulla camera d'incubazione e coprire con una salvietta per evitare esposizione alla luce se la camera non è opaca. Incubare i vetrini per 30 minuti (± 5 minuti) a temperatura ambiente (18-25°C).
- 9. RISCIAQUARE CON PBS**
Togliere i vetrini dal vassoio dell'incubatore e sciacquare brevemente con PBS. Non dirigere il getto direttamente sui pozzetti.
- 10. LAVAGGIO IN PBS** (10 minuti)
Immergere i vetrini in una vaschetta di Coplin o di colorazione contenente PBS. Questo lavaggio può essere prolungato da 10 a 30 minuti senza variazioni nei risultati finali del test quando si usa una colorazione di contrasto.
Colorazione di contrasto facoltativa: aggiungere 2-3 gocce del colorante di contrasto (0,5% Evans Blu) per 100 ml. di PBS prima di immergere i vetrini. Siccome l'intensità della colorazione di contrasto desiderata può variare da individuo a individuo, può essere regolata variando il numero di gocce di colorante aggiunte al PBS in questo lavaggio.
- 11. APPLICARE IL COPRIOGGETTO**
Togliere un vetrino per volta dall'ultimo bagno in PBS e immergerlo 3-5 volte in acqua deionizzata o distillata (Opzionale), poi scuotere leggermente i lati del vetrino su carta bibula o salviette per rimuovere l'acqua in eccesso.
NON ASCIUGARE CON CARTA DA FILTRO O LASCIAR SECCARE I VETRINI IN ALCUN MODO. NON LASCIARE ALL'ARIA SENZA IL VETRINO COPRIOGGETTO PER PIÙ DI 15 SECONDI.
Aggiungere 4-5 gocce della soluzione di montaggio semi-permanente lungo la linea mediana di ciascun vetrino. Appoggiare il vetrino coprioggetto con attenzione, evitando bolle d'aria, adagiando il vetrino coprioggetto lentamente da un'estremità all'altra.
NOTA: un'eccessiva quantità del mezzo di montaggio applicato sul vetrino può causare un'intensa fluorescenza nello sfondo a causa della dispersione di luce o mancanza di una limpida risoluzione delle cellule (immagine sfocata). Questo eccesso di materiale può essere rimosso dal vetrino tamponando dolcemente il coprioggetto con carta assorbente o da lenti, evitando ogni movimento diretto dello stesso.
- 12. LETTURA DEI VETRINI**
La lettura dei vetrini tramite microscopio a fluorescenza convenzionale può essere eseguita immediatamente utilizzando la procedura standard di laboratorio. I vetrini dovranno essere letti sempre da un operatore esperto nel campo dei pattern e nell'interpretazione della fluorescenza ANA. Per istruzioni sull'utilizzo del microscopio a fluorescenza, consultare il fornitore dell'apparecchiatura.

Per la lettura dei vetrini tramite sistema di cattura delle immagini e microscopio automatico di Image Navigator®, prodotti da Immuno Concepts, consultare il manuale di istruzioni che accompagna l'apparecchiatura. Image Navigator® deve essere utilizzato esclusivamente da personale esperto.

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

* I laboratori che intendono effettuare lo screening con una percentuale di diluizione diversa da quella raccomandata devono convalidare l'uso di una diluizione alternativa di screening per la rispettiva popolazione di paziente.