



## **SISTEMA HISTOFLUOR<sup>®</sup> DI TEST DEGLI ANTICORP FLUORESCENTE LKS PER RODITORI**

**Per uso diagnostico in vitro  
Per uso professionale**

*IMPIEGO PREVISTO: Questo è un test di immunofluorescenza indiretta per il rilevamento qualitativo e semi-quantitativo di anticorpi IgG (ANA) in siero umano, da effettuarsi manualmente tramite microscopio a fluorescenza o con il microscopio semiautomatico a fluorescenza Image Navigator<sup>®</sup>. Questo sistema sperimentale va usato come ausilio nel rilevamento di anticorpi mitocondri (AMA), anti cellule parietali (APCA) e anti muscolo liscio (ASMA) associati all'epatite auto immune di tipo 1, colangite biliare primitiva e anemia perniziosa/gastrite autoimmune in congiunzione con dati di laboratorio e clinici. I risultati ottenuti tramite il dispositivo semiautomatico Image Navigator<sup>®</sup> e il software devono essere confermati da un operatore esperto.*

### **RIEPILOGO E SPIEGAZIONE DELLA PROVA**

Gli autoanticorpi presenti nel corpo umano sono diretti contro una serie di antigeni. Molti di questi antigeni sono stati conservati nel tempo, per cui idealmente epitopi antigenici identici possono essere riscontrati nei tessuti animali e umani. Di conseguenza, la prassi di utilizzare tessuti animali per il rilevamento di tali anticorpi è ormai radicata nelle procedure di laboratorio. Molti autoanticorpi rilevati nei tessuti animali sono strettamente correlati a malattie autoimmuni umane specifiche. Il rilevamento e la quantificazione di determinati autoanticorpi consente quindi di diagnosticare e controllare alcune malattie autoimmuni (1,2).

### **PRINCIPI ALLA BASE DELLA PROVA**

Il sistema di analisi Immuno Concepts HistoFluor<sup>®</sup> Rodent LKS utilizza la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta descritta per la prima volta da Weller e Coons (3). I campioni prelevati dai pazienti vengono incubati con un substrato antigenico (fegato/reni/stomaco del roditore) per consentire il legame degli autoanticorpi con i componenti delle cellule. Se sono presenti anticorpi, si crea un complesso antigene-anticorpo stabile. Viene quindi eseguito un lavaggio per rimuovere gli anticorpi aspecifici e non legati, dopo il quale il substrato viene incubato con un anticorpo antiumano 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 antiumano, legato a sua volta all'antigene presente nelle cellule. Tale complesso può essere visualizzato con l'ausilio di un microscopio a fluorescenza. Nei campioni positivi, le cellule presenteranno una fluorescenza color verde mela, con un pattern di colorazione caratteristico della distribuzione di un preciso antigene nelle cellule. Se il campione è negativo per gli anticorpi, le cellule non presenteranno alcun pattern di fluorescenza.

## 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 a una temperatura compresa tra 2 – 25°C. Il mezzo di fissaggio può essere conservato a 2 – 25°C.

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

### REAGENTI REATTIVI

**Vetrini per substrato **SLIDE**:** Sezioni sottili (circa 4-5 micrometri) di fegato di roditore, rene, stomaco o rene e stomaco. I tessuti vanno fissati in una miscela brevettata di acetone, alcol e altri solventi organici, per preservare le proteine del tessuto nella loro configurazione originaria. I vetrini sono disponibili sotto forma di 4-vetrini preparati (topo, numero di catalogo 12004-02; ratto, numero di catalogo 12004-03) e 8-vetrini preparati (topo, numero di catalogo 12008-02; ratto, numero di catalogo 12008-03). I vetrini KS sono disponibili sotto forma di 4-vetrini preparati (topo, numero di catalogo 12004-04; ratto, numero di catalogo 12004-05) e 8-vetrini preparati (topo, numero di catalogo 12008-04; ratto, numero di catalogo 12008-05).

**Controllo positivo specifico degli anticorpi antimitocondriali (AMA) **CONTROL|+**:** Numero di catalogo 12021-02. Fiala contagocce pronta all'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpi IgG specifici per antigeni mitocondriali. Questo siero mostra un pattern di colorazione antimitocondriale specifico positivo sul substrato del tessuto del roditore.

**Siero di controllo negativo **CONTROL|-**:** Numero di catalogo 12031. Fiala contagocce pronta all'uso contenente 1,0 ml di siero di controllo umano negativo. Questo siero può mostrare una debole fluorescenza, ma senza un pattern discernibile di colorazione.

**Reagente anticorpale coniugato con fluoresceina **CONJFITC**:** Numero di catalogo 12009-02 (9,0 ml), 12075-02 (23 ml). Anti IgG umane di capra coniugate con fluoresceina isotiocianato (FITC). Il reagente si presenta pronto all'uso in fialoni contagocce di precisione da 9,0 ml per ogni vetrino in kit per prova completi.

**Controllo positivo opzionale **CONTROL|+**:**  
Numero di catalogo 12022-02 (0,5 ml) - Anticorpi anti cellule parietali (APCA). Fiala contagocce pronta all'uso contenente 0,5 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpi IgG specifici per antigeni di cellule parietali. Questo siero mostra un pattern positivo di celle anti-parietali sul substrato del tessuto del roditore.

Numero di catalogo 12023-02 (0,5 ml) - Anticorpi anti muscolo liscio (ASMA). Fiala contagocce pronta all'uso contenente 0,5 ml di siero di controllo umano positivo con anticorpi IgG specifici per antigeni di cellule parietali. Questo siero mostra un pattern di colorazione sull'anti-muscolo liscio positivo sul substrato del tessuto del roditore.

**Siero di controllo titolabile opzionale **TC**:**  
Numero di catalogo 12261-02 (0,25 ml) - AMA. Fiala pronta all'uso contenente 0,25 ml di siero di controllo umano positivo anti-mitocondrio, da trattare come campione non diluito del paziente. Vedere l'etichetta della fiala per il valore del titolo.

Numero di catalogo 12262-02 (0,25 ml) - APCA. Fiala pronta all'uso contenente 0,25 ml di siero di controllo umano positivo di celle anti parietali, da trattare come campione non diluito del paziente. Vedere l'etichetta della fiala per il valore del titolo.

Numero di catalogo 12263-02 (0,25 ml) - ASMA. Fiala pronta all'uso contenente 0,25 ml di siero di controllo umano positivo di muscolo liscio da trattare come campione non diluito del paziente. Vedere l'etichetta della fiala per il valore del titolo.

### COMPONENTI NON REATTIVI

**Tampone PBS in polvere **PWDR|PBS**:** Numero di catalogo 1011. 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 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 **SOLNIMM**: Numero di catalogo 1111. Fiala con contagocce contenente 5,0 ml di glicerolo-tamponato, pronto per l'uso.

**Vetrini coprioggetto CVSLP**: Numero di catalogo 1042. Ciascun pacchetto contiene dieci vetrini di vetro, 24 x 64 mm.

## MATERIALI SUPPLEMENTARI NECESSARI MA NON FORNITI

Micropipette con capacità di 30 – 40 µl  
Vaschette di Coplin o di colorazione  
Spruzzetta o pipette Pasteur  
Pipette graduate  
Flaconi da un litro (per tampone PBS)  
Acqua deionizzata o distillata  
Provette per allestire le diluizioni dei sieri  
Carta da filtro e salviette di carta  
Camera di incubazione  
Guanti monouso  
Timer da laboratorio  
Microscopio a 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 questo prodotto 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 Centers for Disease Control and Prevention (Centri per il controllo e la prevenzione delle malattie-CDC) o nel Manuale dei National Institutes of Health (Istituti Sanitari Nazionali-NIH): *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, edizione del 1999.
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 in alcuni reagenti. Questa può reagire con tubature in piombo o rame formando sali d'azide esplosivi. Nell'eliminare i 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 il siero al calore per 30 minuti a 56 °C per ottenere risultati ottimali. Non utilizzare siero contaminato con elevata carica microbica.
7. Non fumare, mangiare né bere in aree dove sono manipolati campioni o reagenti del kit.
8. Evitare schizzi o formazione d'aerosol.
9. Tempi d'incubazione e temperature diverse da quelle specificate possono generare risultati errati.
10. Contaminazioni crociate tra reagenti o campioni possono generare risultati inattendibili.
11. La strumentazione in vetro riutilizzabile dev'essere lavata a fondo e sciacquata accuratamente prima dell'uso. Inoltre, tutta la strumentazione in vetro dev'essere pulita e asciutta al momento dell'uso.
12. Portare tutti i reagenti, i vetrini e i campioni a temperatura ambiente (18 – 25 °C) prima dell'uso.
13. Indossare guanti monouso quando si maneggiano campioni e reagenti e lavarsi accuratamente le mani al termine del lavoro.
14. La contaminazione microbica dei reagenti e dei campioni può produrre risultati errati.
15. 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.

## RACCOLTA DEI CAMPIONI

**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 venipuntura 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:** non usare il siero se esibisce un grado elevato d'emolisi o è marcatamente itterico o iperlipemico o si rileva una crescita microbica, perché queste condizioni possono causare risultati anomali. I campioni torbidi devono essere resi limpidi prima del test mediante la centrifugazione.

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

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

## 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 nelle strutture di tessuto appropriate, 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, aspecifica e di bassa intensità, ma senza un pattern discernibile di colorazione nucleare. Il controllo del PBS è usato per osservare un'eventuale colorazione aspecifica 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.

È importante che l'intensità della fluorescenza non venga confusa con la presenza o l'assenza di anticorpi. 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.

### CONTROLLO TITOLABILE OPZIONALE:

I sieri di controlli titolabili sono intesi per l'uso nel monitoraggio della riproducibilità da lotto a lotto e da serie a serie. Essi non sono intesi come una misurazione della sensibilità o della specificità del test.

Nella lettura dei titoli, molti laboratori cominciano con i contenitori che contengono i campioni più diluiti e leggono a ritroso fino alla diluizione 1:20.

Il titolo medio e la gamma del titolo ( $\pm$  una diluizione su ciascun lato della media), determinati per ciascun numero di lotto, sono stati stabiliti nel nostro laboratorio e indicati come valori guida. Questi valori sono messi a disposizione per consentire a ciascun laboratorio di valutare la riproducibilità (precisione) delle proprie procedure di analisi. Dato che questo tipo di controllo non intende essere un indicatore di accuratezza del titolo, ciascun laboratorio dovrebbe stabilire il proprio punto medio di equivalenza per il campione, e utilizzare tali dati per valutare la riproducibilità interfase (precisione).

Attraverso analisi multiple di questo controllo titolabile, usando il sistema di analisi in fluorescenza Immuno Concepts Histofluor® Rodent LKS, 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.

I valori ottenuti nel nostro laboratorio possono differire da quelli di chiunque altro.

Tra i molti fattori che possono influenzare i risultati vi sono, in via esemplificativa:

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. I filtri d'eccitazione a interferenza forniscono una maggior sensibilità in una lunghezza d'onda molto più stretta rispetto ai filtri d'eccitazione ad assorbimento. Consultare il manuale o il rivenditore del microscopio a fluorescenza utilizzato per ulteriori informazioni.
4. Un corretto allineamento del raggio di luce del microscopio. Consultare il manuale del microscopio a fluorescenza utilizzato per le relative 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 AN di 0,85. L'apertura numerica è stampata sul fianco dell'obiettivo.
6. Filtri di soppressione. I filtri di soppressione diminuiscono le lunghezze d'onda d'eccitazione specifiche e si possono usare per ridurre la sensibilità. Consultare il manuale o il rivenditore del microscopio a fluorescenza utilizzato per ulteriori informazioni.
7. La precisione e l'esattezza della tecnica di diluizione, la strumentazione e l'esecuzione delle procedure della prova.

### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DEL PAZIENTE

Si raccomanda di leggere i vetrini una prima volta con ingrandimento totale 100X per eseguire lo screening visivo di positività e/o negatività dei campioni, per poi passare a un ingrandimento totale di 200X per eseguire il riconoscimento del pattern specifico.

**Negativo:** un siero è considerato negativo per anticorpi antinucleari se non presenta un pattern chiaramente discernibile. Il tessuto può mostrare una colorazione debole, ma senza manifestare un pattern chiaramente discernibile.

**Positivo:** un siero è considerato positivo se il tessuto presenta un pattern di colorazione chiaramente discernibile.

**Titoli:** Nella lettura dei titoli, molti laboratori cominciano con i contenitori che contengono i campioni più diluiti e leggono a ritroso fino alla diluizione 1:20. Il primo contenitore in cui viene riscontrato un pattern di colorazione chiaramente identificabile determina il titolo. Consigliamo questa tecnica per la determinazione del titolo. È importante che l'intensità della colorazione non sia confusa con la presenza o l'assenza di anticorpi anti parietali o anti mitocondrio. Il fattore chiave da tenere in considerazione quando si determina se una certa diluizione di siero è positiva è la comparsa di un pattern chiaramente riconoscibile, a prescindere dall'intensità della colorazione.

## REFERTAZIONE DEI RISULTATI

**Screening:** i risultati dovrebbero essere refertati come positivi o negativi alla diluizione 1:20, seguiti dal tipo di pattern di colorazione.

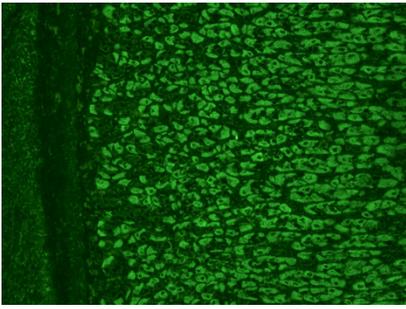
**Titolazione:** I risultati devono riportare l'ultima diluizione della serie in cui è distintamente percepibile la colorazione. Risultati con forti reazioni alla diluizione 1:320 devono essere riportati come maggiori di 1:320.

### DEFINIZIONE DEL PATTERN

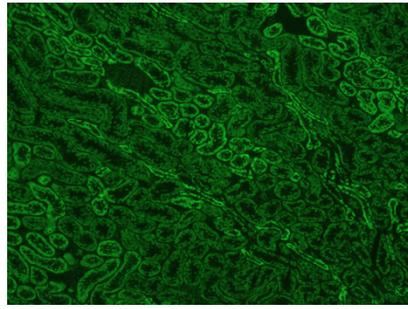
**Anticorpo antimitocondriale (AMA):** colorazione citoplasmatica granulare delle cellule di Kupffer e degli epatociti nella sezione del fegato. Una colorazione citoplasmatica granulare si verifica anche nei tubuli renali, con la colorazione massima raggiunta nei tubuli distali, più ricchi di mitocondri rispetto a quelli prossimali. Infine, anche il citoplasma delle cellule gastriche mostra una colorazione granulare, maggiore nelle cellule parietali che in quelle principali.

**Antigene:** l'antigene tipicamente rilevato nei mitocondri è M2, un complesso di diversi peptidi antigenici del complesso piruvato deidrogenasi (PDH).

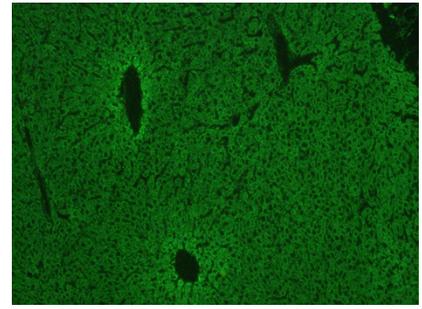
**Malattie associate:** gli AMA sono presenti nel 95% dei pazienti affetti da cirrosi biliare primitiva (PBC) (4,5).



**AMA nello stomaco dei roditori**



**AMA nel rene dei roditori**

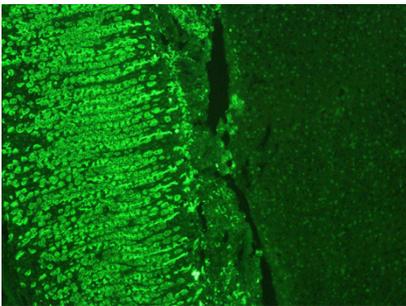


**AMA nel fegato dei roditori**

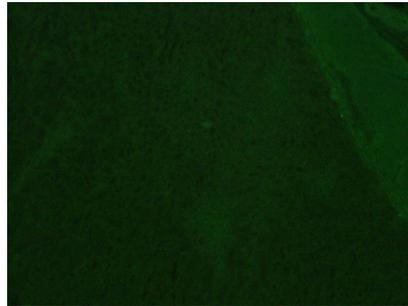
**Anticorpi anti cellule parietali (APCA):** il tessuto dello stomaco mostra colorazione citoplasmatica granulare brillante delle cellule parietali in pattern lineari e paralleli, senza colorazione delle cellule principali. L'antigene non è espresso nel rene o nel fegato dei roditori, per cui questi tessuti risultano negativi e mostrano solo una fluorescenza nello sfondo.

**Antigene:** l'antigene è la pompa protonica H<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPasi.

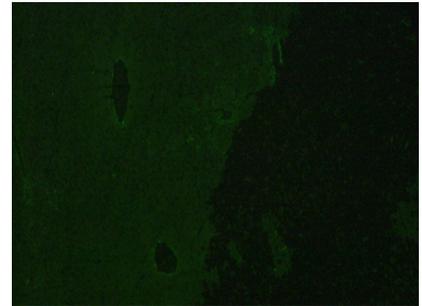
**Malattie associate:** gli APCA sono presenti in più del 90% dei pazienti affetti da anemia perniciosa. Gli anticorpi possono essere inoltre riscontrati in pazienti affetti da gastrite atrofica autoimmune, frequente precursore dell'anemia perniciosa (6,7).



**ASMA nello stomaco dei roditori**



**ASMA nel rene dei roditori (negativo)**

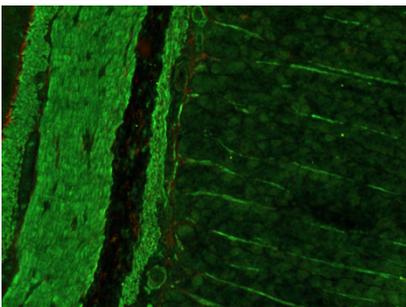


**ASMA nel fegato dei roditori (negativo)**

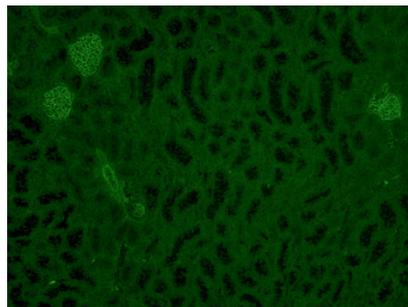
**Anticorpi anti muscolo liscio (ASMA):** Nello stomaco il tessuto mostra una colorazione brillante delle fibre della muscolatura liscia nella muscularis propria, nella muscularis mucosae, nell'area della ghiandola intragastrica e negli strati di muscolatura liscia delle arterie. il tessuto del fegato mostra colorazione brillante delle fibre della muscolatura liscia nelle pareti delle arterie. Nel rene, la titolazione elevata di anticorpi antiactina può andare incontro a reazione crociata con le fibre di tubulina nei glomeruli.

**Antigene:** l'actina è l'antigene clinicamente più importante. Sono stati tuttavia descritti anticorpi diretti a vimentina, tubulina, desmina e altre proteine nelle fibre della muscolatura liscia.

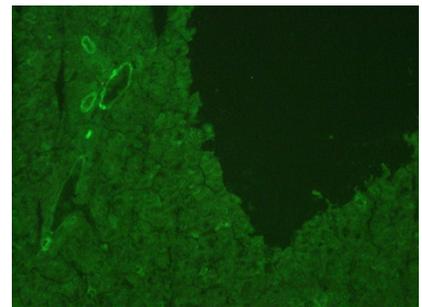
**Malattie associate:** epatite cronica autoimmune (tipo 1) (8-10).



**ASMA nello stomaco dei roditori**



**ASMA nel rene dei roditori**



**ASMA nel fegato dei roditori**

## LIMITAZIONI DELLA PROVA

1. La diagnosi non può essere fatta solamente sulla base del rilevamento dell'anticorpo nel tessuto del roditore. Il medico deve interpretare tali risultati tenendo presenti l'anamnesi e la sintomatologia del paziente, i dati dell'esame fisico e altre procedure diagnostiche.
2. Una cura non dovrebbe essere iniziata sulla sola base della positività a una prova di ricerca di anticorpi. Le indicazioni cliniche, altri risultati di laboratorio e l'impressione clinica del medico devono essere tenuti in considerazione prima di iniziare qualunque trattamento.
3. Sebbene una reazione positiva possa essere considerata molto indicativa di una malattia del tessuto connettivo, non dovrebbe essere considerata come diagnostica, ma piuttosto come una parte dell'anamnesi complessiva del paziente.
4. I pattern della colorazione spesso cambiano con la titolazione progressiva del siero. Questo fenomeno è generalmente causato dalla presenza di più di una condizione di malattia.
5. A causa delle molte opzioni disponibili sui microscopi a fluorescenza, è raccomandato l'uso di sorgenti di luce, filtri e ottiche standardizzati quando si paragonano i titoli dei pazienti e tra laboratori.
6. Immuno Concepts suggerisce l'utilizzo di cellule coltivate e transfettate (HEp-2000<sup>®</sup>) per la rilevazione o l'identificazione degli ANA, sconsigliando a tal fine l'uso di tessuto di roditore.

## CARATTERISTICHE DELLA PERFORMANCE

Il sistema Histofluor<sup>®</sup> di test LKS per roditori è stato comparato a un altro kit di test immuno fluorescenti di anticorpi del tessuto di roditori, che è distribuito in commercio mediante 170 test caratterizzati clinicamente. I campioni sono stati sottoposti a test in tre siti e letti da tre operatori differenti in ciascun sito. Usando un microscopio fluorescente convenzionale, sono stati ottenuti i seguenti dati: I valori di concordanza rappresentano l'aggiudicazione del consenso delle due migliori tra le tre conclusioni.

### Tessuto del Ratto

Concordanza positiva: 92,3 % (79 - 98,1)  
Concordanza sul pattern: 92,3 % (79 - 98,1)  
Concordanza negativa: 97,8 % (93,4 - 99,5)  
Concordanza globale: 98,2 % (94,7 - 99,6)

### Tessuto del Topo

Concordanza positiva: 94,4 % (80,9 - 99,4)  
Concordanza sul pattern: 94,4 % (80,9 - 99,4)  
Concordanza negativa: 98,5 % (94,5 - 99,9)  
Concordanza globale: 98,8 % (95,5 - 99,9)

### UTILIZZO CON IMAGE NAVIGATOR<sup>®</sup>

L'Image Navigator<sup>®</sup> è un sistema di microscopio semi automatico immunologico per la lettura di vetrini a fluorescenza Histofluor<sup>®</sup>. Una comparazione tra la lettura del monitor Image Navigator<sup>®</sup> con la lettura convenzionale dei vetrini a fluorescenza del tessuto di roditori del sistema di test LKS Histofluor<sup>®</sup>, è stato eseguito usando 170 campioni caratterizzati clinicamente in tre siti e letti in ciascun sito da tre operatori differenti. I valori di concordanza rappresentano l'aggiudicazione del consenso delle due migliori tra le tre conclusioni.

### Tessuto del Ratto

Concordanza positiva: 100 % (87,9 - 100)  
Concordanza sul pattern: 100 % (87,9 - 100)  
Concordanza negativa: 100 % (96,6 - 100)  
Concordanza globale: 100 % (97,3 - 100)

### Tessuto del Topo

Concordanza positiva: 100 % (88,5 - 100)  
Concordanza sul pattern: 100 % (88,5 - 100)  
Concordanza negativa: 100 % (96,7 - 100)  
Concordanza globale: 100 % (97,3 - 100)

La sensibilità clinica per il rilevamento di anticorpi in pazienti diagnosticati con anemia perniziosa, epatite autoimmune di tipo 1 o colangite biliare primaria è mostrata nelle seguenti tabelle. In questi studi, una diluizione virale di 1:20 è stata usata per determinare i valori positivi.

<b>Sensibilità Clinica (95% CI)</b>		Fegato/Rene/Stomaco del Topo Histofluor <sup>®</sup>			
Diagnosi	N	Convenzionale	% Positiva	Image Navigator <sup>®</sup>	% Positiva
Anemia Perniziosa	12	5	41.7% (19.3-68.1)	5	41.7% (19.3-68.1)
Epatite Autoimmune di Tipo 1	19	9	47.4% (27.3-68.3)	9	47.4% (27.3-68.3)
Cholangite Biliare Primaria	18	15	83.3% (60.0-95.0)	15	83.3% (60.0-95.0)

<b>Sensibilità Clinica (95% CI)</b>		Fegato/Rene/Stomaco del Ratto Histofluor <sup>®</sup>			
Diagnosi	N	Convenzionale	% Positiva	Image Navigator <sup>®</sup>	% Positiva
Anemia Perniziosa	12	6	50.0% (25.4-74.6)	6	50.0% (25.4-74.6)
Epatite Autoimmune di Tipo 1	19	9	47.4% (27.3-68.3)	9	47.4% (27.3-68.3)
Cholangite Biliare Primaria	18	15	83.3% (60.0-95.0)	15	83.3% (60.0-95.0)

La specificità clinica è stata determinata in un gruppo di 121 pazienti con malattie autoimmuni diverse dall'anemia perniziosa, dall'epatite autoimmune di tipo 1 o dalla colangite biliare primaria. I dati ottenuti da queste comparazioni sono mostrati nella tabella seguente. In questi studi, una diluizione virale di 1:20 è stata usata per determinare i valori positivi.

<b>Specificità Clinica (95% CI)</b>		Histofluor <sup>®</sup> Topo Liver/Kidney/Stomach			
Gruppo	N	Convenzionale	% Negativa	Image Navigator <sup>®</sup>	% Negativa
Pazienti Autoimmuni	121	114	94.2% (88.3-97.4)	114	94.2% (88.3-97.4)

<b>Specificità Clinica (95% CI)</b>		Histofluor <sup>®</sup> Ratto Liver/Kidney/Stomach			
Gruppo	N	Convenzionale	% Negativa	Image Navigator <sup>®</sup>	% Negativa
Pazienti Autoimmuni	121	113	93.4% (87.3-96.8)	113	93.4% (87.3-96.8)

**Precisione:** Secondo i requisiti di CLSI EP05-A3, tredici campioni sono stati sottoposti a test in tre esemplari in dieci eventi a tre siti indipendenti. Il set di campioni includeva quattro campioni positivi AMA, quattro campioni positivi APCA, quattro campioni positivi ASMA e un campione negativo. Ogni risultato è stato letto sia secondo la modalità convenzionale, sia mediante il monitor Image Navigator<sup>®</sup> da due lettori diversi. Per dimostrare i dati in un formato semi-quantitativo, la concordanza finale del titolo è mostrata qui di seguito per entro i siti e tra i siti. Tutti gli accordi erano > 90%.

Riproducibilità Multi siti, Multi lettori (% di accordo con/95% CL)								
Substrato	Misura	n	Convenzionale			Monitor (Semi automatico)		
			Site 1 v 2	Site 1 v 3	Site 2 v 3	Site 1 v 2	Site 1 v 3	Site 2 v 3
RATTA	Positiva	720	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)
	Negativa	60	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)
	Pattern	720	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.4-100)
	± 1 Titer	720	95.4% (93.6-96.7)	95.8% (94.1-97.1)	96.5% (94.9-97.7)	95.3% (93.5-96.6)	95.3% (93.5-96.6)	96.7% (95.1-97.8)
TOPO	Positiva	720	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)
	Negativa	60	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)	100.0% (92.8-100)
	Pattern	720	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.1->99.9)	100.0% (99.4-100)	100.0% (99.1->99.9)
	± 1 Titer	720	94.9% (93.0-96.3)	97.8% (96.4-98.7)	94.4% (92.5-95.9)	96.8% (95.2-97.9)	98.9% (97.8-99.5)	96.5% (94.9-97.7)

## BIBLIOGRAFIA

1. Nakamura RM, Chisari FV, Edington TS. Laboratory tests for diagnosis of autoimmune diseases. *Prog Clin Pathol.* 1975;6:177-203.
2. Craig WY, Ledue TB, Collins MF, et al. Serologic associations of anti-cytoplasmic antibodies identified during anti-nuclear antibody testing. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44:1283-1286.
3. Weller TH, Coons AH. Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1954;86:789-794.
4. Jones DEJ. Autoantigens in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol.* 2000;53:813-821.
5. Purohit T, Cappell MS. Primary biliary cirrhosis: Pathophysiology, clinical presentation and therapy. *World J Hepatol.* 2015;7:926-941.
6. Toh B-H. Pathophysiology and laboratory diagnosis of pernicious anemia. *Immunol Res.* 2017;65:326-330.
7. De Aizpurua HJ, Cosgrove LJ, Ungar B, Toh B-H. Autoantibodies cytotoxic to gastric parietal cells in serum of patients with pernicious anemia. *NEJM.* 1983;309:625-629.
8. Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Clinical significance of autoantibodies and autoimmune hepatitis. *J Autoimm.* 2013;46:17-24.
9. Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, et al. Autoantibodies and defined target the auto antigens in autoimmune hepatitis: an overview. *Eur J Intern Med.* 2002;13:293-303.
10. Czaja AJ. Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 1999;30:394-401.

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



Produttore



Rappresentante autorizzato  
nella Comunità europea



Limitazione di  
temperatura



Contenuto sufficiente per <n>  
test



Vedere le istruzioni  
per l'uso



Dispositivo medico per uso  
diagnostico in vitro



MDSG 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  
 Assistenza tecnica USA: +1.800.251.5115 Non USA: +1.916.363.2649  
 E-mail: [technicalsupport@immunoconcepts.com](mailto:technicalsupport@immunoconcepts.com)

# PROCEDURA DI TEST CON REAGENTE FLUORESCENTE PER TESSUTI DI TOPI HISTOFLUOR®

**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, l'erogazione dei volumi e i tempi di incubazione siano conformi a quanto indicato di seguito.

## 1. RICOSTITUZIONE DEL TAMPONE (PBS)

Sciogliere il contenuto di una bustina di tampone in 1 litro d'acqua deionizzata o distillata. Il tampone PBS può essere sigillato e conservato a 2 – 25 °C fino a un massimo di quattro settimane.

## 2. DILUIZIONE DEI CAMPIONI PRELEVATI DAL PAZIENTE

Screening: diluire i campioni fino a 1:20 aggiungendo 0,05 ml (50 µl) di siero a 0,95 ml (950 µl) di PBS ricostituito.

Titolazione semi-quantitativa: realizzare diluizioni in serie di campioni di screening e di controllo titolabile (ad es.: 1:40, 1:80, 1:160, 1:320) mediante tampone PBS.

## 3. PREPARAZIONE DEI VETRINI DI SUBSTRATO (30 – 40 µl/pozzetto)

Togliere il/i vetrino/i dalla/e bustina/e e immettere il siero di controllo nei pozzetti di controllo secondo le seguenti indicazioni: capovolgere la fiala con contagocce e premere dolcemente finché non comparirà una goccia sulla punta. Appoggiare delicatamente la goccia nel pozzetto di controllo specifico, evitando il contatto diretto fra la punta del contagocce e la superficie del vetrino. Applicare una goccia (30 – 40 µl) del campione da testare su ciascun pozzetto numerato.

**NOTA:** per effettuare uno screening generale si consiglia il controllo positivo antimitocondriale; per quanto riguarda la titolazione semi-quantitativa, si dovrebbe eseguire, per ciascun lotto di campioni del paziente, un controllo titolabile o un numero di catalogo 12261-02, 12262-02 o 12263-02. Tutti i controlli dei pattern dovrebbero essere eseguiti per ciascun numero di lotto dei kit, per dimostrare la prevista presenza dei pattern ANA.

**ATTENZIONE:** IL CONTATTO DIRETTO FRA LA PUNTA DEL CONTAGOCCE E LA SUPERFICIE DEL VETRINO PUÒ DANNEGGIARE IL SUBSTRATO ANTIGENICO.

## 4. INCUBAZIONE DEI VETRINI (30 ± 5 minuti a temperatura ambiente, es. 18 – 24 °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 – 24 °C).

## 5. RISCIAQUO CON PBS

Al termine dell'incubazione togliere i vetrini dalla piastra di incubazione e sciacquare brevemente con PBS usando la spruzzetta, le pipette Pasteur o quelle graduate. Non dirigere il getto direttamente sui pozzetti.

**NOTA:** per evitare la contaminazione incrociata fra i pozzetti del vetrino, direzionare il getto PBS lungo la linea mediana del vetrino, inclinandolo prima verso la fila di pozzetti superiore e poi verso quella inferiore.

## 6. LAVAGGIO CON 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. REAGENTE ANTICORPALE CONIUGATO CON

**FLUORESCINA** (coprire i pozzetti con 12 – 14 gocce)

Rimuovere un vetrino per volta dal PBS. Tamponare il lato del vetrino con carta da filtro o con salviette di carta per rimuovere il tampone in eccesso. Reinscrivere immediatamente il vetrino nella camera di incubazione e coprire completamente i pozzetti utilizzando reagente anticorpale. Iniziare lasciando cadere una goccia in ogni pozzetto. Ripetere quest'operazione per ogni vetrino. Il reagente anticorpale coniugato con fluoresceina è stato titolato per compensare il tampone residuo rimasto sul vetrino dopo il risciacquo.

**NOTA:** è importante che i pozzetti per i vetrini non si asciugano durante questa procedura; in caso contrario potrebbero verificarsi danni al substrato.

NON LASCIAR COAGULARE O ASCIUGARE IN ALCUN MODO, NÉ LASCIARE CHE IL VETRINO RESTI PRIVO DI REAGENTE ANTICORPALE CONIUGATO CON FLUORESCINA PER PIÙ DI 15 SECONDI.

## 8. INCUBAZIONE DEI VETRINI (30 ± 5 minuti a temperatura ambiente, es. 18 – 24 °C)

Applicare il coperchio sulla camera di incubazione e coprirlo con una salvietta di carta per evitare che il vetrino risulti esposto alla luce qualora la camera non sia opaca. Lasciare incubare per 30 minuti (± 5 minuti) a temperatura ambiente (18 – 24 °C).

## 9. RISCIAQUO CON PBS

Togliere i vetrini dalla piastra di incubazione e sciacquare brevemente con PBS. Non dirigere il getto direttamente sui pozzetti.

## 10. LAVAGGIO CON PBS (10 minuti)

Immergere i vetrini per 10 minuti in una vaschetta di colorazione o di Coplin contenente PBS. Quando non viene usata alcuna colorazione di contrasto, questo lavaggio può essere prolungato per 10 – 30 minuti senza variazione alcuna nei risultati finali del test.

## 11. APPLICAZIONE DEL COPRIOGGETTO

Rimuovere un vetrino per volta dal PBS. Tamponare il lato del vetrino con carta da filtro o con salviette di carta per rimuovere il tampone in eccesso.

NON LASCIAR COAGULARE O ASCIUGARE IL VETRINO IN ALCUN MODO, NÉ LASCIARE CHE RESTI PRIVO DI COPRIOGGETTO PER PIÙ DI 15 SECONDI. Aggiungere 4 – 5 gocce di liquido di montaggio semipermanente lungo la linea mediana di ciascun vetrino Appoggiare il coprioggetto con attenzione, evitando bolle d'aria, adagiandolo lentamente da un'estremità all'altra.

**NOTA:** l'applicazione di un'eccessiva quantità del liquido di montaggio 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). Il liquido in eccesso può essere rimosso dal vetrino tamponando dolcemente il coprioggetto con carta assorbente o da lenti, evitando ogni movimento diretto dello stesso.

## 12. LETTURA DEL VETRINO

Se il vetrino deve essere letto tramite microscopia a fluorescenza convenzionale, può essere letto immediatamente, usando le procedure di laboratorio standard. I vetrini devono sempre essere esaminati da un operatore qualificato esperto nell'interpretazione della sezione e dei pattern dei tessuti fluorescenti. Per istruzioni sull'impiego del microscopio a fluorescenza si faccia riferimento al produttore dello strumento.

Per la lettura dei vetrini tramite sistema di cattura delle immagini e microscopio automatico di Image Navigator®, prodotti da Immuno Concepts, consultare il manuale dell'operatore per il sistema Image Navigator®. L'Image Navigator® produce immagini digitali di ciascun contenitore e presenta una vista panoramica della sezione di tessuto che può essere controllata da un operatore esperto. Image Navigator® deve essere utilizzato esclusivamente da personale esperto.

### PER ASSISTENZA TECNICA:

USA: +1-800-251-5115 Non USA: +1-916-363-2649

Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

