

Per uso diagnostico *In Vitro*

Codice Prodotto: 704170, 704180
504170.10, 504180.25

Complessità CLIA: elevata

Finalità d'uso

Questo prodotto è utilizzato per lo screening e la titolazione degli autoanticorpi circolanti nel siero umano come supporto nella diagnosi e nel trattamento di varie malattie autoimmuni. I quattro autoanticorpi principali individuati sono gli antinucleo (ANA), gli antimitocondrio (AMA), gli anti-muscolatura liscia (ASMA) e gli anti-cellule parietali gastriche (AGPCA).

Riassunto e Spiegazione del test

L'immunofluorescenza indiretta è il metodo di riferimento per lo screening e la titolazione degli autoanticorpi circolanti nel siero. Le sezioni di tessuto di origine animale, come il ratto, generalmente sono preferibili ad altri substrati comunemente usati come le sezioni di tessuto umano e i preparati cellulari; ciò è dovuto principalmente all'assenza d'interferenza con il sistema HLA e/o con gli altri anticorpi diretti contro i gruppi sanguigni. L'utilizzo dei tre diversi tessuti (fegato, rene e stomaco) permette d'identificare più facilmente gli autoanticorpi confrontando i risultati ottenuti con ogni tessuto.

Determinati autoanticorpi sono associati a diverse patologie. Gli ANA sono quasi sempre presenti nel lupus eritematoso sistemico (LES), ma si osservano anche comunemente nei pazienti affetti da malattie reumatiche e del tessuto connettivo. Gli AMA si osservano con frequenza nelle cirrosi biliari primitive ma si possono anche individuare nei pazienti con altre malattie epatiche. Gli ASMA sono frequentemente associati all'epatite cronica attiva e alla cirrosi biliare primitiva, ma sono anche identificabili a basse concentrazioni in diverse altre condizioni. Gli AGPCA sono presenti nel siero della maggior parte dei pazienti affetti da anemia perniziosa. Una descrizione più particolareggiata dell'associazione degli autoanticorpi con certe patologie è riportata al sezione di risultati.¹⁻⁹

Principio della Metodica

Il kit usa una tecnica di immunofluorescenza indiretta in cui i campioni dei pazienti e i relativi controlli sono incubati sui vetrini con substrato.¹⁰ Gli anticorpi non specifici sono eliminati con il lavaggio, quindi viene applicato un coniugato fluorescente specifico. Il coniugato non legato viene eliminato con il lavaggio. Per la lettura dei vetrini si usa un microscopio a fluorescenza. I campioni positivi presentano una fluorescenza di colore verde che corrisponde alle aree della sezione dove l'autoanticorpo si è legato.

Reagenti

1. Sezioni di fegato, rene, stomaco di ratto su vetrini da 5 o 10 pozzetti, con desecante

Solo kit:

2. Siero di controllo positivo ANA Omogeneo Pattern, contenente lo 0,09% di sodio azide. **Prediluito, pronto all'uso.**
3. Controllo Negativo Sistemi IFA contenente lo 0,09% di sodio azide. **Prediluito, pronto all'uso.**
4. Antisiero di pecora anti-IgG umane (H+L) purificato per affinità coniugato con FITC (isotiocianato di fluoresceina) contenente lo 0,09% di sodio azide. **Prediluito, pronto all'uso.**
5. Siero di controllo positivo Mitocondrio (AMA) Pattern, contenente lo 0,09% di sodio azide. **Prediluito, pronto all'uso.**
6. Siero di controllo positivo Muscolatura liscia (ASMA) Pattern, contenente lo 0,09% di sodio azide. **Prediluito, pronto all'uso.**
7. Blu di Evans all'1% colorazione di contrasto opzionale
8. Tampone PBS soluzione liquida concentrata (x40)
9. Carte assorbenti per asciugare il vetrino dopo il lavaggio
10. Soluzione di montaggio contenente un agente 'anti-affievolimento' (DABCO) 1, 4 diazodiciclo [2.2.2] ottano
11. Vetrini coprioggetti

Avvertenze/ Precauzioni

Tutti i sieri umani forniti nel kit sono stati sottoposti a screening per donatori, risultando negativi per l'antigene di superficie dell'epatite B e per gli anticorpi verso i virus HIV1, HIV2 e HCV. Ciò nonostante, questi test non possono garantire l'assenza di agenti infettivi. Devono essere stabiliti metodi di trattamento e di eliminazione adeguati come per tutti i materiali potenzialmente infettivi e le procedure devono essere eseguite soltanto da personale esperto ed autorizzato. Il Blu di Evans e i controlli del kit contengono lo 0,09% di sodio azide come conservante e devono essere trattati con cautela – non ingerire né permettere il contatto con la pelle o le mucose. In caso di contatto, lavare con molta acqua e rivolgersi al medico. Azotidri metallici esplosivi si possono formare con il rame e il piombo. Quando si procede all'eliminazione del reagente, lavare con molta acqua i recipienti allo scopo di evitare l'accumulo di azide. Il prodotto deve essere utilizzato esclusivamente da personale adeguatamente formato. Si raccomanda di attenersi rigorosamente alla procedura indicata.

Condizioni di conservazione

I kit o i vetrini non aperti devono essere conservati a 2-8°C e possono essere usati fino alla data di scadenza indicata. NON CONGELARE. Una volta estratti dal loro involucro, i vetrini devono essere usati immediatamente. Il tampone PBS diluito può essere conservato fino ad un mese a 2-8°C. Tutti i reagenti devono essere conservati a 2-8°C.

Raccolta dei campioni

I prelievi di sangue devono essere effettuati per via venosa. Lasciare che il sangue si coaguli in modo naturale. Separare il siero il più rapidamente possibile onde evitare l'emolisi. Il siero può essere conservato a 2-8°C per un massimo di 7 giorni prima del dosaggio¹¹, oppure per periodi più lunghi, aliquotare e conservare a -20°C o temperature inferiori. NON congelare e scongelare più di una volta. Evitare l'uso di sieri lipemici, emolizzati o contaminati da batteri in quanto si potrebbero avere titoli più bassi o pattern di colorazione non chiari.

Procedura

Materiali forniti (kits)

704170

1. 10 x *Rat liver, kidney, stomach slide (5-well)* (Vetrini da 5 pozzetti con fegato, rene, stomaco di ratto)
2. 1 x 1mL *ANA Homogeneous Pattern* (ANA Omogeneo Pattern. Prediluito, pronto all'uso)
3. 1 x 1mL *IFA System Negative Control* (Controllo Negativo Sistemi IFA. Prediluito, pronto all'uso)
4. 1 x 1mL *Mitochondrial (AMA) Pattern* (Mitocondrio (ASMA) Pattern. Prediluito, pronto all'uso)
5. 1 x 1mL *Smooth Muscle (ASMA) Pattern* (Muscolatura Liscia (ASMA) Pattern). Prediluito, pronto all'uso)
6. 1 x 7mL *FITC IgG (H&L) Conjugate* (Coniugato IgG (H+L) FITC purificato per affinità)
7. 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (Blu di Evans all'1%)
8. 2 x 25mL *PBS Buffer* (PBS concentrato, x40)
9. 1 x 3mL *Mounting Medium* (Soluzione di montaggio)
10. 20 x *Blotters* (Carte assorbenti)
11. 10 x *Coverslips* (Vetrini coprioggetti)
12. 1 x *Instruction Leaflet* (1x scheda tecnica)

704170

1. 25 x *Rat liver, kidney, stomach slide (10-well)* (Vetrini da 10 pozzetti con fegato, rene, stomaco di ratto)
2. 1 x 1mL *ANA Homogeneous Pattern* (ANA Omogeneo Pattern. Prediluito, pronto all'uso)
3. 1 x 1mL *IFA System Negative Control* (Controllo Negativo Sistemi IFA. Prediluito, pronto all'uso)
4. 1 x 1mL *Mitochondrial (AMA) Pattern* (Mitocondrio (ASMA) Pattern. Prediluito, pronto all'uso)
5. 1 x 1mL *Smooth Muscle (ASMA) Pattern* (Muscolatura Liscia (ASMA) Pattern). Prediluito, pronto all'uso)
6. 1 x 15mL *FITC IgG (H&L) Conjugate* (Coniugato IgG (H+L) FITC purificato per affinità)
7. 1 x 3mL *1% Evans Blue Counterstain* (Blu di Evans all'1%)
8. 2 x 25mL *PBS Buffer* (PBS concentrato, x40)
9. 1 x 10mL *Mounting Medium* (Soluzione di montaggio)
10. 50 x *Blotters* (Carte assorbenti)
11. 25 x *Coverslips* (Vetrini coprioggetti)
12. 1 x *Instruction Leaflet* (1x scheda tecnica)

Materiali forniti (vetrini)

1. **504170.10** - 10 x *Rat liver, kidney, stomach slide (5-well)* (Vetrini da 5 pozzetti con fegato, rene, stomaco di ratto)
O
2. **504180.25** - 25 x *Rat liver, kidney, stomach slide (10-well)* (Vetrini da 10 pozzetti con fegato, rene, stomaco di ratto)
3. Scheda tecnica

Materiale necessario ma non fornito

Acqua distillata per diluire il PBS

Recipiente per contenere il PBS

Micropipette e puntali monouso per dispensare i campioni dei pazienti

Camera umida per le fasi d'incubazione

Microscopio a fluorescenza con filtro a 495nm (exciter) e filtro a 515nm (barrier)

Bottiglia di plastica a pressione per lavaggio iniziale in PBS

Se si usano solo i vetrini, è possibile ottenere da INOVA Diagnostics alcuni componenti aggiuntivi: il PBS (508002), il Controllo Negativo Sistemi IFA (508186), il omogeneo ANA Pattern (504054), il Mitocondrio (AMA) Pattern (504052), il Muscolatura liscia (ASMA) Pattern (FA134), IgG (H+L) FITC (504021, 504072), la soluzione di montaggio (504046, 504047) e la soluzione Blu di Evans all'1% (504049).

Procedura

Controllo qualità

I controlli negativi e positivi devono essere usati ogni volta che sono dosati i campioni.

1. **Soluzione di montaggio.** Togliere la soluzione di montaggio dal frigorifero per portarla a temperatura ambiente (18-28°C) prima dell'uso.
2. **Diluire il PBS concentrato.** Diluire il PBS con acqua distillata (1 parte di PBS + 39 parti di acqua distillata) e miscelare. Il PBS viene usato per diluire i campioni dei pazienti e come tampone di lavaggio.
3. **Diluire i campioni dei pazienti.**
Screening: Diluire i campioni 1/20 aggiungendo 50µL di siero in 950µL di PBS.
Titolazione: Effettuare diluizioni seriali dei campioni positivi con PBS (p.e. 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320 ecc.)
Per esempio: Prendere 100µL della diluizione 1/20 e diluire con 100µL di PBS per ottenere una diluizione 1/40. Ripetere questa procedura per ulteriori diluizioni.
4. **Vetrini con substrato.** I vetrini devono raggiungere la temperatura ambiente (18-28°C) prima di essere tolti dalla confezione. Etichettare correttamente i vetrini, metterli nella camera umida e aggiungere una goccia di ciascun controllo positivo e negativo nei rispettivi pozzetti. Aggiungere 50µL dei campioni diluiti nei pozzetti rimanenti.
5. **Incubazione vetrini.** Incubare i vetrini per 20 minuti in una camera umida a temperatura ambiente (18-28°C).

6. **Lavaggio PBS.** Togliere i vetrini dalla camera umida e risciacquarli brevemente con il PBS in una bottiglia di plastica a pressione. Non spruzzare direttamente nei pozzetti. Posizionare i vetrini in un rack e immergerli nel PBS, poi agitare per 5-10 minuti.
7. **Aggiunta del coniugato fluorescente.** Eliminare l'eccesso di PBS e asciugare intorno ai pozzetti con le carte assorbenti fornite. Riportare i vetrini nella camera umida e coprire **immediatamente** ogni pozzetto con una goccia di coniugato fluorescente. **NON LASCIARE I POZZETTI SCOPERTI PER OLTRE 15 SECONDI.** L'essiccazione del substrato compromette seriamente i risultati.
8. **Incubazione dei vetrini.** Incubare i vetrini per 20 minuti in una camera umida a temperatura ambiente (18-28°C) al buio.
9. **Lavaggio con PBS.** Lavare nuovamente come descritto nella punto qui sopra. Colorazione di contrasto opzionale. Aggiungere fino a 2-3 gocce di Blu di Evans all' 1% per 100mL di PBS prima di immergere i vetrini.
10. **Montaggio con il vetrino coprioggetti.** Rimuovere un vetrino alla volta dal lavaggio PBS. Asciugare rapidamente intorno ai pozzetti e aggiungere una goccia della soluzione di montaggio in ciascun pozzetto. Mettere con cura il vetrino sul vetrino coprioggetti, evitando le bolle d'aria, ma se ci sono non tentare di rimuoverle. Rimuovere la soluzione di montaggio in eccesso intorno al bordo del vetrino coprioggetti.
11. **Letture dei vetrini con il microscopio a fluorescenza.** I vetrini possono essere conservati a 2-8°C al buio fino a 3 giorni, senza una significativa perdita di fluorescenza.

Risultati

Controllo qualità

Il ANA Omogeneo Pattern deve presentare una fluorescenza color verde brillante nei nuclei delle cellule. Il Mitocondrio (AMA) Pattern deve presentare una fluorescenza verde brillante dei tubuli renali e delle cellule parietali gastriche. Il Muscolatura Liscia (ASMA) Pattern deve presentare una fluorescenza verde brillante nello strato muscolare dello stomaco. Il controllo negativo deve presentare una colorazione verde scura in tutti i tessuti, senza fluorescenza visibile. Se i controlli non risultano come sopra descritto, il test non è valido e deve essere ripetuto.

Interpretazione dei risultati

Risultato negativo

Si osserva una colorazione verde scuro in tutte le sezioni, senza fluorescenza visibile. Reazioni deboli sospette devono essere ripetute ma aumentando il fattore di diluizione (p.e. 1/40). Se dopo avere ripetuto il test, il risultato sembra uguale a quello iniziale, il test viene considerato negativo.

Risultato positivo

Si osserva una fluorescenza significativa nelle zone tissutali specifiche che presentano uno o più dei seguenti pattern:

Anticorpi antinucleo (ANA)

Gli ANA colorano i nuclei delle cellule epatiche, dei tubuli renali distali e prossimali, delle cellule principali e parietali gastriche. Quasi tutti i pazienti affetti da LES hanno degli ANA nel loro siero, ma gli ANA possono anche essere presenti in varie patologie del tessuto connettivo compresa l'artrite reumatoide. Inoltre gli ANA si possono osservare nei casi di epatite cronica attiva, di cirrosi biliare primitiva e in risposta a determinate terapie farmacologiche.

E' possibile ottenere ulteriori informazioni interpretando i pattern nucleari degli ANA osservati nei test (vedere qui di seguito). Si raccomanda di titolare tutti i campioni ANA positivi fino all'end-point per garantire l'individuazione di eventuali reazioni miste che altrimenti potrebbero andare perse. Si consiglia inoltre un'analisi supplementare di questi campioni per ricercare gli autoanticorpi diretti contro il DNA a doppio filamento e gli antigeni nucleari estraibili (ENA).

Pattern	Antigeni comuni coinvolti	Patologia associata
Omogeneo	DNA a doppio filamento, istoni	LES Artrite reumatoide (AR) Connettiviti miste Lupus farmaco-indotto
Periferico (Bordo)	DNA a doppio filamento/Nativo	LES
Granulare	Antigeni nucleari estraibili Ribonucleoproteina, Scl-70, SSB	Sclerodermia Sindrome di Sjögren Connettiviti miste LES
Nucleolare	4-6S sRNA	Sclerodermia, Sindrome di Sjögren LES, AR e sclerosi sistemica progressiva

I pattern di colorazione degli autoanticorpi specifici dei tessuti comprendono:

Anticorpo	Tessuto associato	Principali patologie associate
Anticorpi antimicondrio (AMA)	Citoplasma dei tubuli distali renali e dei tubuli prossimali (in minor misura) Citoplasma delle cellule epatiche (fegato) e citoplasma delle cellule parietali gastriche (stomaco)	Cirrosi biliare primitiva e altre patologie epatiche
Anticorpi antimuscolatura liscia (ASMA)	Strati muscolari (stomaco) Strati muscolari arteriole (altri tessuti)	Epatite cronica attiva
Anticorpi anti cellule parietali gastriche (AGPCA)	Cellule parietali (stomaco)	Anemia perniciosa
Anticorpi antireticolina (ARA)	Fibre peritubulari e capsule di Bowman (rene) Membrane cellulari epatiche, pareti sinusoidali (fegato)	Morbo di Crohn Morbo celiaco Dermatite erpetiforme

NB: Ogni laboratorio deve stabilire a che punto un risultato positivo è considerato clinicamente significativo.

Limitazioni del test

- Questo test da solo non permette la formulazione di una diagnosi. E' necessario prendere in considerazione tutti gli altri fattori compresa l'anamnesi clinica dei pazienti e altri risultati sierologici o derivanti da biopsie.
- I pattern di colorazione spesso variano quando un campione è titolato fino al suo end-point. Ciò è dovuto di solito alla presenza di più di un autoanticorpo, soprattutto per gli ANA.
- Un risultato negativo con questo kit può essere dovuto ad una remissione della patologia o alla presenza di autoanticorpi non identificabili con questa tecnica.
- La fonte luminosa, i filtri e l'ottica dei microscopi a fluorescenza di diverse marche influiranno sulla sensibilità del test. La performance del microscopio è influenzata notevolmente da una corretta manutenzione, e in particolare dalla centratura e dalla sostituzione della lampada a vapori di mercurio dopo il periodo di tempo consigliato.
- Gli autoanticorpi possono essere attivati o indotti da un'ampia varietà di farmaci compresi i contraccettivi orali e gli antibiotici.
- Poiché sui vetrini con 10 pozzetti, questi ultimi sono a breve distanza l'uno dall'altro, è possibile una contaminazione incrociata dei campioni e dei controlli. Bisogna fare attenzione affinché ciò non si verifichi soprattutto nelle fasi di lavaggio.
- L'idoneità all'uso del kit con reagenti IFA di altri fabbricanti non è stata valutata ma l'uso con tali reagenti non deve essere necessariamente escluso.

I vetrini venduti separatamente vengono classificati come "Reagenti analita-specifici".

Ad eccezione di un componente del kit, le caratteristiche analitiche e prestazionali non sono stabilite.

Valori previsti e prestazioni

Risultati attesi

Valori normali

Anticorpo	Percentuale di insorgenza	Riferimento
ANA	0-2	2
AMA	0-8	7
ASMA	3	2
ARA	5	8
AGPCA	10-15 (in pazienti anziani)	9

Valori anormali

	Diagnosi clinica	Percentuale d'insorgenza	Riferimento
ANA	LES	99	4
	Connettiviti miste	90	3
	Altre malattie autoimmuni (AR, sclerodermia, Sindrome di Sjögren, dermatomiosite)	15-50	3,5
AMA	Cirrosi biliare primitiva	>95	3
ASMA	Epatite cronica	70	3
	Cirrosi biliare primitiva	50	3
ARA	Morbo di Crohn	24	6
	Morbo celiaco	38-50	3,6
	Dermatite erpetiforme	22	6
AGPCA	Anemia perniciosa	90	9

Studio comparativo

E' stato eseguito uno studio comparativo su 96 campioni clinici utilizzando questo kit e un metodo di riferimento disponibile sul mercato. 93 su 96 campioni dosati hanno fornito risultati identici con i due metodi. Per i pattern descritti al punto risultati, la sensibilità relativa variava dall' 89 al 100%, la specificità relativa era del 100% in ogni caso e la concordanza relativa variava dal 93 al 100%. Per i campioni che hanno dato risultati diversi, è stata ottenuta una debole colorazione ANA o SMA positiva in ciascun caso soltanto con il metodo di riferimento, suggerendo così che tali campioni erano borderline quel particolare pattern e/o che esistevano delle leggere differenze di sensibilità tra i due metodi.

Riassunto del metodo

1. Portare il mezzo di montaggio a temperatura ambiente.
2. Diluire il PBS con acqua distillata.
3. Diluire i sieri dei pazienti 1/20 con PBS.
4. Portare i vetrini a temperatura ambiente (18-28°C).
5. Applicare 50µL dei controlli positivi e negativi e dei sieri dei pazienti diluiti nei rispettivi pozzetti.
6. Incubare in una camera umida per 20 minuti.
7. Lavare per 5-10 minuti in PBS.
8. Asciugare bene intorno ad ogni pozzetto e coprire immediatamente ogni pozzetto con una goccia di coniugato.
9. Incubare come nella fase 6 al buio.
10. Lavare come nella fase 7.
11. Montare.
12. Leggere il vetrino con il microscopio a fluorescenza.

Bibliografia

1. Tan E M (1989). Antinuclear Antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* **44**, 93-151.
2. Doniach, D, et al. (1986). Tissue antibodies in primary biliary cirrhosis, active chronic (lupoid) hepatitis, cryptogenic cirrhosis and other liver diseases and their clinical implications. *Clin. Exp. Imm* **1**: 237-262.
3. Wallington, T B & Gooi H C (1990). *Clinical Immunology. A practical approach.* Ed. Gooi, H C & Chapel, H. Publ. IRL Press, Oxford UK. 195-220.
4. Cavallaro, J J, et al (1976). Immunofluorescent detection of autoimmune diseases, Immunology Series No. 7. CDC, Atlanta, GA.
5. Seah, P P et al (1971). Antireticulin antibody: Tissue autoantibodies in dermatitis herpetiformis and adult coeliac disease. *Lancet* **1**, 834-836.
6. Seah, P P et al (1973). Antireticulin antibody: Incidence and diagnostic significance. *Gut* **14**, 311-315.
7. Goudie, R B et al (1966). Serological and histological diagnosis of primary biliary cirrhosis. *J. Clin. Path.* **19**, 527-538.
8. Rizzeto, M & Doniach, D (1973). Types of reticulin antibodies detected in human sera by immunofluorescence. *J. Clin. Path.* **26**, 841-851.
9. Bird, A G (1990). *Clinical Immunology. A practical approach.* Ed. Gooi, H C & Chapel, H. Publ. IRL Press, Oxford, UK. Pg.175-194.
10. Weller, TH, Coons, AH (1954). Fluorescent antibody studies with agents of Varicella and Herpes zoster propagated in vitro. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **86**, 789 – 794.
11. Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004. Ed. A Milford Ward, GD Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

Fornitore:

INOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America

Technical Service (U.S. & Canada Only) : 877-829-4745
Technical Service (Outside the U.S.) : 00+ 1 858-805-7950
info@inovadx.com

Rappresentante Autorizzato:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

624170ITA

April 2010
Revision 0

