

INDIRECT FLUORESCENCE ASSAY FOR IgG ANTINUCLEAR ANTIBODY HEp2

For In Vitro Diagnostic Use

I-ANA01G 120 Tests

Intended Use

The SCIMEDX Indirect Fluorescence Assay (IFA) for IgG Antinuclear Antibody (ANA) HEp2 is intended for the qualitative and semi-quantitative detection of IgG (Immunoglobulin G) antinuclear antibodies in human serum. Detection of ANA in humans can be used as an aid in the diagnosis of autoimmune connective tissue diseases.

Introduction and Summary of Test Procedures

Systemic autoimmune diseases are characterized by a variety of autoantibodies specific for nuclear and cytoplasmic molecules involved in DNA replication, DNA transcription and messenger RNA (mRNA) translation. The autoantibodies are produced as a result of an imbalance in the natural immunoregulatory network, most likely caused by infectious agents (1-3). The manifestations of systemic autoimmunity are either due to the direct effects of these autoantibodies or to antigen-antibody deposition (1).

Circulating serum autoantibodies to nuclear antigens (ANA) are present in a number of diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis, discoid lupus, scleroderma, Sjögren's syndrome, liver disease, ulcerative colitis and myasthenia gravis. Approximately 5% of people without disease symptoms have significant levels of ANA (4, 5). The indirect fluorescent antibody (IFA) technique of Coons (6) was adapted to ANA testing by Friou (7, 8). It has since become the method of choice for screening and quantitation of ANA (9). The use of a tissue culture substrate, HEp2, provides a clear spectrum of nuclear staining patterns, unavailable with other substrates that may be associated with specific disease states (10-15). In addition, the HEp2 cell line is the recommended substrate for detection of anti-centromere antibody which is highly selective for the CREST variant of progressive systemic sclerosis (10).

Mixed patterns of ANA may commonly be observed with rheumatic disease sera, reflecting the simultaneous occurrence of multiple ANAs in the same serum (9). The IFA technique is very effective in localizing antigens in the nucleus, nucleoplasm or cytoplasm (9).

Principle of the Test

SCIMEDX fluorescent antibody assays use the indirect method of antibody detection and titer determination. Diluted patient serum samples are applied to cultured cells containing inactivated antigens provided on paint delineated wells on glass microscope slides. During a 30 minute incubation, antibody specific for nuclear antigens forms an antigen/antibody complex with the nuclear antigens in the cells. In a brief washing step, nonspecific antibody and other unreacted serum proteins are eliminated. Fluorescein-conjugated goat anti-human IgG is then applied to the wells of the glass slide. The anti-IgG conjugate combines with human IgG, if present, during a 30 minute incubation. After a brief wash to remove unreacted conjugate, the slides are viewed by fluorescence microscopy. A positive antibody reaction is denoted by bright green fluorescence at the antigen sites.

Materials Furnished and Storage Conditions

ANA HEp2 Antigen Slides: Slides of HEp2 cells on each glass well. The slides are ready for use after removal from protective pouch. Store at 2-8°C. Slides are stable at this storage condition until the expiration date stated on the pouch label.

ANA IgG Positive Control: Each vial contains 0.5 ml ANA IgG positive human control. This component is a ready for use liquid. Store at 2-8°C. Liquid positive control is stable at this storage condition until the expiration date stated on the vial label.

ANA IgG Negative Control: Each vial contains 0.5 ml ANA IgG negative human control. This component is a ready for use liquid. Store at 2-8°C. Liquid negative control is stable at this storage condition until the expiration date stated on the vial label.

Fluorescein Conjugate: Each vial contains 1.5 ml fluorescein conjugated goat (inactivated) antihuman IgG (heavy and light chain) with Evans Blue and Rhodamine counterstains. The fluorescein conjugate is a conjugation of affinity chromatography purified antihuman IgG with fluorescein isothiocyanate (FITC). Adding Evans Blue and Rhodamine counterstains to the conjugate masks nonspecific fluorescence of the tissue culture cells. This component is a ready for use liquid. Store at 2-8°C. Liquid conjugate is stable at this storage condition until the expiration date stated on the vial label.

Coverslip Mounting Media: Each vial contains 2.0 ml phosphate buffered glycerol with fade retardant. This component is a ready for use liquid. Storage temperature may range from refrigerated to room temperatures (2-30°C). Mounting media is stable at either storage condition until the expiration date stated on the vial label.

Phosphate Buffered Saline (PBS): Each aluminized sealed packet of powdered buffer makes one liter of 1X PBS. Storage temperatures may range from refrigerated to room temperature (2-30°C). Add the entire contents of a PBS packet to one liter of freshly prepared distilled or deionized water. Note: Addition of the salts while rapidly stirring the water will facilitate solubilization. Store PBS as a solution at 2-8°C.

Special Blotters: Absorbent blotters have pre-cut holes for use in drying the slide mask. Storage temperatures may range from refrigerated to room temperature (2-30°C).

Additional Materials Required

- Test tubes, racks, pipettes, microtiter plates and safety pipetting devices for making sample dilutions
- 37°C incubator
- Moist chamber for incubating slides
- Slide holder rack and staining dish for washing slides
- Coverslips: 22 X 50 mm No. 1 thickness glass

Fluorescence microscope: A fluorescence microscope equipped with the following was used to calibrate the controls and conjugate:

- 10X eyepiece
- 16X or 40X objectives
- Epi-illuminator with 50W halogen lamp
- FITC-excitation filter KP490
- Yellow absorbing filter K530
- Red suppression filter BG38

The fluorescein label has an excitation peak of 490 nm and an emission peak of 520 nm. Differences in endpoint reactivities and fluorescence intensities may be due to the type and condition of the fluorescence equipment used in your laboratory.

General Precautions

No US Standard of Potency. For *in vitro* diagnostic use only.

- Store all kit components at their recommended or suggested temperatures. **Do not freeze.**
- Do not use the components beyond the stated expiration date of each component.
- SCIMEDX optimizes all of the active components in each lot of its IFA kits as a unit. Do not mix components from different lots or from different sources.
- The controls and conjugate contain 0.095% sodium azide that, if allowed to accumulate, can form explosive compounds in lead and/or copper plumbing. Flush drains thoroughly if used to dispose of these materials.
- Use separate pipette tips for each sample and reagent to avoid cross contamination.
- Reagents should be inspected for evidence of bacterial or fungal contamination.

Antigen slides: All IFA antigen slides have fixed cells that do not contain any viable infectious agents. However, good laboratory practices (GLP) require careful slide handling and disposal as with any other potentially biohazardous laboratory material.

- Do not remove the slides from their protective pouch until ready for use.
- The reported concentration of anti-ANA in a given specimen determined with assays from different manufacturers can vary due to differences in assay methods and reagent specificity.
- Do not reuse substrate slide.

Human Controls: The human controls in these kits have all been tested for hepatitis B surface antigen (HBsAg) and human immunodeficiency virus (HIV) antibody by FDA licensed methods and found to be non-reactive. However, no test system can ensure the absence of these agents. Handle all human serum components, including those received in your laboratory for testing, as potentially biohazardous. For guidelines refer to the Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 1993.

Xn-Harmful Substance US

Component	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Precautionary Statement Prevention:
Pictogram		<ul style="list-style-type: none"> • Wash thoroughly after handling. • Wear eye/face protection
Signal Word	WARNING	<ul style="list-style-type: none"> • IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. • If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
Hazard Statement	Causes serious eye irritation.	<ul style="list-style-type: none"> • Dispose of content and/or container in accordance with local, regional, national, and/or international regulations.

EU

Component	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Precautionary Statement Prevention:
Pictogram		P264 Wash thoroughly after handling. P280 Wear protective gloves and clothing.
Signal Word	WARNING	P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses if easy to do. Continue rinsing.
Hazard Statement	H319 Causes serious eye irritation.	P337+P313 If irritation persists, get medical advice/attention.

Control and Conjugate Safety Precaution:

Concentration of sodium azide in these components is classified as Harmful and subject to the following risk phrase: "Harmful if swallowed and contact with acids liberates very toxic gas."

Specimen Collection, Storage and Limitations of Test Samples

- Separate aseptically collected serum from the red blood cells and store frozen (-10°C or lower) until ready for testing. Avoid repeated freezing and thawing. For recommendations for collecting and storing blood specimens refer to the NCCLS publication, "Approved Standard – Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A.
- If desired, store fresh liquid serum samples at 2° to 8°C for up to one week without loss of antibody activity.
- Do not use hemolyzed, lipemic or icteric samples.
- Do not use visibly contaminated samples.
- Serum samples must not be heat inactivated prior to use.
- Do not add anticoagulants or preservatives to serum samples.

IFA Procedure

1. For qualitative IgG antibody determination, prepare a 1:40 screening dilution of each test sample in PBS. Prepare all dilutions in a minimum volume of 0.10 ml with PBS as the diluent.
2. For semi-quantitative titration of sera, prepare two-fold serial dilutions of the serum sample in PBS, starting with a 1:40 dilution, and adding equal volumes of diluted serum or plasma and PBS for each consecutive dilution.
3. Remove slides from protective pouch and apply 1 drop (approximately 20 µl) of the diluted test sample(s) to each well. Add sufficient volume to completely cover each well, but cross-mixing of contents between wells should not occur. Note: Each day's test run requires one well each for positive control, negative control, and PBS (conjugate control). Incubate the slides in a moist chamber for 30 minutes at 37°C.
4. Rinse the slides in a light stream of buffer. Avoid directing the stream at the wells.
5. Wash the slides for 10 minutes with a change of PBS solution after 5 minutes. Agitate the slides by moving the rack up and down in the buffer.
6. Blot the paint mask surrounding the test wells with the special blotters.
7. Apply one drop of the ready to use conjugate to each test well.
8. Repeat steps 4 (incubation), 5 (PBS rinse), 6 (10 minute PBS wash), and 7 (blot).
9. Apply the glycerol mounting media and 22 X 50 mm glass coverslip.
10. Observe the reactivity under fluorescence microscopy using 20-40X magnification. For best results, examine slides immediately after completion of the test. To obtain equivalent results, seal slides or keep humidified to minimize dehydration of mounting medium, store in dark at 2-8°C, and read within three days. Positive reactivity may range in fluorescence intensity from brilliant to weak. Grade the fluorescence reaction according to the following intensity scale: 4* (brilliant), 3* (bright), 2* (moderate) and 1* (weak).

Interpretation of Results

- Bright green fluorescent staining of the nuclei of the cells, in a clear pattern of fluorescence, denotes an ANA positive reaction. Samples that are positive at a 1:40 dilution should be titrated to the endpoint dilution. In a titration series, the highest

serum dilution demonstrating a 1⁺ reaction is interpreted as the endpoint. The observable patterns of nuclear fluorescence are:

Pattern	Characteristics	Associated Diseases
Homogeneous	Diffuse staining of the entire nucleus due to antibodies reactive with DNA-Nucleoprotein-Histone complexes (15).	SLE Rheumatoid Arthritis
Speckled	Specks of staining throughout the nucleus due to antibodies to Sm, RNP, SSA or SSB (16, 17).	Scleroderma Raynaud's Syndrome Sjögren's Syndrome Mixed Connective Tissue Disease
Nucleolar	Staining of the nucleolar structure due to antibodies against RNA-nucleoprotein complexes (10).	Scleroderma
Peripheral	Staining of the nuclear membranes due to antibodies against DNA (18, 19).	SLE
Anti-Centromere	Staining of the centromere regions of chromosomes due to reaction with a protein tightly bound to centromeric DNA (9, 10).	CREST Syndrome Variant of Progressive Systemic Sclerosis

- Absence of specific fluorescent pattern associated with the cell nucleus denotes an ANA negative reaction.

Significance of Interpretation

No discernible fluorescence of the cellular nuclei found at the screening dilution.	Test sample is negative for IgG ANA.
Specific positive fluorescence of the cellular nuclei found at the screening dilution or at higher dilutions.	Test sample is positive for IgG ANA.

Quality Control

- To ensure the test is working properly, use the positive and negative controls at least once for each day's testing. If the expected result for the controls is not met, the results are invalid and the test should be repeated.
- The type and age of the fluorescence microscope and hours of UV bulb usage can affect fluorescence intensity and titration endpoints to some degree. The ANA positive control furnished with this kit demonstrates a 3⁺ to 4⁺ intensity reaction. The vial has a listed titer to use as an additional check for the test system (see 1⁺ Dilution Notice). Use this as the calibrator for a 3⁺ to 4⁺ intensity reaction on your microscope.
- Use the ANA negative control furnished with this kit as the calibrator for a negative reaction on your equipment.
- Each day's test should include one PBS well in place of a test sample. This is a conjugate control to ensure the conjugate is not reacting with the cell substrate.
- Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state or federal regulations or accrediting organizations. For guidance on appropriate quality control practices, please refer to NCCLS document C24-A, Internal Quality Control Testing: Principles and Definitions.

1⁺ Dilution Notice

The positive control in this kit is ready to use and provides a 3⁺ to 4⁺ fluorescent intensity when tested. To obtain a 1⁺ fluorescent intensity make two-fold dilutions to the titer indicated on the vial included in this kit. Titer the positive control with the initial use of the kit.

The titer you obtain in testing may differ from the listed endpoint titer due to a number of technical reasons. It is best to test the titer indicated on the vial, as well as the two-fold dilution immediately preceding and following the listed titer. It is normal for results obtained for an endpoint (1⁺) titer to differ between laboratories due to factors affecting the intensity of fluorescence. These factors include:

- the power rating of the UV light source in the microscope
- the kind of light source
- the age of the lamp
- the length of the optical path of the microscope and the types of optical filters used
- the accuracy of dilution techniques and the dilution equipment

Limitations of the Procedure

- No single serological determination should be used as a sole criterion for detection. All available clinical and laboratory data should be included for diagnostic purposes.
- Patients with SLE or other autoimmune phenomena may show wide variations in ANA titers depending upon the clinical stage of the disease. An ANA titer is, therefore, not usually helpful in distinguishing disease states. High titers of ANA (1:1280 or above), however, may provide evidence of MCTD, SLE or scleroderma, especially if patterns of nucleolar, speckled or peripheral staining are observed.
- A number of therapeutic drugs have been reported to induce antinuclear antibodies in patients (e.g. procainamide, hydralazine, oral contraceptives, diphenylhydantoin, mephenytoin and some antibiotics). It is important to consider this information in determining evidence of disease.
- Low titers of antinuclear antibody may be found in the sera of normal individuals. Apparently healthy individuals may contain ANA in their sera. This percentage increases with age, particularly past the 6th decade of life (5, 22).
- If a sample is positive for more than one pattern, one of the patterns may partially or completely obscure the other. In this circumstance titration of the serum is required.
- SLE patients being treated with steroids may produce negative test results.
- The assay should be performed on serum. The use of other matrices has not been established.

Expected Values

The prevalence of ANA IgG antibodies in the normal population is expected to be zero. However, apparently healthy, asymptomatic individuals may contain ANA in their sera. This percentage increases with age, particularly past the sixth decade of life.

To demonstrate the prevalence of ANA in a normal population, sera from 99 normal individuals of various ages and genders, from various geographic locations were tested on the SCIMEDX anti-ANA IFA. Eighty-eight samples were negative for IgG antibodies to ANA (88.9%). Eleven samples were positive for IgG antibodies to ANA (11.1%).

Anti-ANA Prevalence in a Normal Population

Age Group	Total Samples	# Positive	Prevalence
12 - 19	20	1	5%
20 - 29	10	0	0%
30 - 39	16	2	12.5%
40 - 49	13	1	7.7%
50 - 59	10	0	0%

60 - 69	10	1	10.0%
>70	20	6	30.0%
Total	99	11	11.1%

To demonstrate the prevalence of ANA in a population of SLE patients' sera from 100 SLE patients were tested on the SCIMEDX anti-ANA IFA. Ninety-two samples were positive for IgG antibodies to ANA (92%). Eight samples were negative for IgG antibodies to ANA (8%).

Performance Characteristics

Relative Sensitivity and Specificity: The SCIMEDX ANA IFA kit was evaluated relative to a commercially available ANA IFA. The samples were frozen retrospective sera. One hundred sera were from patients diagnosed with SLE. Ninety-nine sera were from normals of various ages, gender and geographical areas. The overall agreement was 188/197 or 95%. The table below summarizes the data.

SCIMEDX ANA IFA				
Alternate IFA	ANA Status	Positive	Negative	Total
	Positive	100*	7	107
	Negative	2	88	90
	Total	102	95	197

*98/100 positive sera demonstrated the same pattern on the two assays. 2/100 samples showed different patterns.

Please be advised that 'relative' refers to the comparison of this assay's results to that of a similar assay. There was not an attempt to correlate the assay's results with disease presence or absence. No judgment can be made on the comparison assay's accuracy to predict disease.

Titer Agreement: Twenty-five positive sera were serially two-fold diluted and the endpoint titer was determined on the SCIMEDX ANA IFA and a commercially available ANA IFA. The endpoint titer results are as follows:

Identical Titer	12/25
± one, two-fold dilution	11/25
± two, two-fold dilutions	2/25

Reproducibility: Three positive sera with various titers (1:80, 1:640 and 1:2560) and one negative serum were serially diluted and assayed three times each on three different assays and the endpoint determined. All endpoint titers were within the specifications of ± one two-fold dilution. Refer to the following table.

Identical Titer	35/36
± one, two-fold dilution	1/36

Real Time Stability: Real time stability testing of kit components was carried out at 6 month intervals for a minimum of 24 months. The endpoint titers of the positive and negative controls were compared to the endpoint titers at release. Acceptance criteria are endpoint titers within one two-fold dilution of each other. These results were within specifications.

Real Time Stability

Slide Lot	Control	Endpoint Titer at Release	Endpoint Titer at 24 months
#1	Positive	1:1280	1:1280
	Negative	-	-
#2	Positive	1:1280	1:640
	Negative	-	-
#3	Positive	1:1280	1:640
	Negative	-	-

Literature Cited

1. Sinha, A.A., T. Lopez, and H.O. McDevitt. 1990. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. Science. 248:1380-1388.
2. Kotb, M. 1995. Infection and immunity: a story of the host, the pathogen, and the copathogen. Clin. Immunol. Immunopathol. 74:10-22.
3. Nygård, N.R. and B.D. Schwartz. 1993. Infection and autoimmunity. Adv. Int. Med. 38:337-359.
4. Ehrenstein, M. and D. Isenberg. 1991. Autoimmunity associated with infection: leprosy, acute rheumatic fever and Lyme disease. Curr. Opin. Immunol. 3:930-935.
5. Condemi, J.J., E.V. Barnett, E.C. Atwater, R.F. Jacob, E.S. Mongan, and J.H. Vaughan. 1965. The significance of antinuclear factors in rheumatoid arthritis. Arth. and Rheum. 8:1080-1093.
6. Coons, A.H. 1958. Fluorescent antibody methods, p. 399-422. In J.F. Danielli (ed.), General cytochemical methods, vol. 1. Academic Press, New York.
7. Friou, G.J. 1958. Identification of nuclear component of interaction of lupus erythematosus globulin and nuclei. J. Immunol. 80:476-481.
8. Friou G.J., S.C. Finch, and K.D. Detre. 1958. Interaction of nuclei and globulin from lupus erythematosus serum demonstrated with fluorescent antibody. J. Immunol. 80:324-329.
9. Tan, E.M. 1982. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. Adv. Immunol. 33:167-240.
10. Tan, E.M., G.P. Rodnian, G. Ignacio, Y. Moroi, M.J. Fritzler, and C. Peebles. 1980. Diversity of anti-nuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome. Arth. and Rheum. 23:617-625.
11. Burnham, T.K. and P.W. Bush. 1974. Antinuclear antibodies. I. Patterns of nuclear immunofluorescence. J. Invest. Dermatol. 62:526-534.
12. Hall, A.P., W.A. Bardwil, T.B. Bayles, A.D. Mednis, and N. Galins. 1960. The relations between the antinuclear, rheumatoid and L.E.-cell factors in the systemic rheumatic diseases. N. Engl. J. Med. 263:769-775.
13. Pollack, V.E. 1964. Antinuclear antibodies in families of patients with systemic lupus erythematosus. N. Engl. J. Med. 271:165-171.
14. Raskin, J. 1964. Fluorescent antibody studies of certain dermatoses. Arch. Derm. 89:569-578.
15. Luciano, A. and N.F. Rothfield. 1973. Patterns of nuclear fluorescence and DNA-binding activity. Ann. Rheum. Dis. 32:337-341.
16. Friou, G.J. 1964. Immunofluorescence and antinuclear antibodies. Arth. and Rheum. 7:161-166.
17. Beck, J.W. 1962. Partial identification of the "speckled" nuclear antigen. Lancet 2: 241-242.
18. Tan, E.M. and H.G. Kunkel. 1966. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. J. Immunol. 96:464-471.
19. Beck, J.S. 1963. Autoantibodies to cell nuclei. Scot. Med. J. 8:373-388.
20. Casals, S.P., G.J. Friou, and L.L. Meyers. 1964. Significance of antibody to DNA in systemic lupus erythematosus. Arth. and Rheum. 7:379-390.
21. Anderson, J.R., K.G. Gray, J.S. Beck, W.W. Buchanan and A.J. McElhinney. 1962. Precipitating autoantibodies in the connective tissue diseases. Ann. Rheum. Dis. 21:360-369.
22. Whittingham, S., J. Irwin, and I.R. McKay. 1969. Autoantibodies in healthy subjects. Aust. Ann. Med. 18:130-134.

SCIMEDX CORPORATION
53 Richbenton Rd
Dover, NJ 07801 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8796
www.scimedx.com

Medimark Europe
11, rue Zola – BP 2332
F-38033 Grenoble Cedex 2 - France



Indirekter Immunfluoreszenz-Assay auf IgG antinukleäre Antikörper (ANA) HEp2

Die Tests sind für die *diagnostische Verwendung in vitro* bestimmt.

I-ANA01G 120 Tests

Verwendungszweck

Der indirekte Immunfluoreszenz-Assay (IFA) für IgG antinukleäre Antikörper (ANA) HEp2 von SCIMEDX CORP dient zum qualitativen und semi-quantitativen Nachweis von IgG (Immunglobulin G) antinukleären Antikörpern in Humanserum. Der Nachweis von ANA beim Menschen kann verwendet werden, um die Diagnose autoimmuner Bindegewebserkrankungen zu erleichtern.

Einführung und Übersicht über die Testverfahren

Systemische Autoimmunerkrankungen werden durch verschiedene Autoantikörper charakterisiert, die spezifisch für nukleäre und zytoplasmatische Moleküle sind. Diese Moleküle sind an der DNA-Replikation, DNA-Transkription und der Messenger RNA (mRNA) Translation beteiligt. Die Autoantikörper werden infolge eines Ungleichgewichts im Immunregulations-System produziert, das meistens durch infektiöses Material verursacht wird (1–3). Die systemische Autoimmunität manifestiert sich entweder durch die direkten Auswirkungen dieser Autoantikörper oder durch Antigen-Antikörper-Ausscheidung (1).

Zirkulierende Serum-Autoantikörper gegen nukleäre Antigene (ANA) sind bei einer Vielzahl von Erkrankungen vorhanden, wie z. B. systemischer Lupus erythematoses (SLE), rheumatoide Arthritis, Lupus erythematoses discoides, Sklerodermie, Sjögren-Syndrom, Lebererkrankungen, Colitis ulcerosa und Myasthenia gravis. Ca. 5 % der asymptomatischen Patienten weisen signifikante Mengen an ANA auf (4,5).

Die indirekten Immunfluoreszenz-Antikörpertests (IFA) von Coons (6) wurden von Friou (7,8) für ANA-Tests angepasst. Inzwischen ist dies die bevorzugte Methode für Screening-Tests und die Quantifizierung von ANA (9). Durch die Verwendung eines Gewebezellkultursubstrats (HEp2) wird ein klares Spektrum an nukleären Färbemustern erzielt, die auf bestimmte Erkrankungen (10–15) hinweisen können. Diese Färbemuster können mit anderen Substraten nicht erzielt werden. Die HEp2-Zelllinie ist das empfohlene Substrat zum Nachweis von antizentromeren Antikörpern, die besonders bei der CREST-Variante von progressiver Sklerodermie (10) auftreten.

Gemischte ANA-Muster sind oft bei Seren mit rheumatischen Erkrankungen zu beobachten, da gleichzeitig mehrere ANAs im gleichen Serum (9) auftreten. Die IFA-Technik ist besonders geeignet, um Antigene im Nucleus, Nucleolus oder Zytoplasma (9) zu finden.

Testprinzip

Die Immunfluoreszenz-Antikörpertests von SCIMEDX Corp. verwenden die indirekte Methode zum Nachweis von Antikörpern und zur Titerbestimmung. Verdünnte Patientenserumproben werden in Zellkulturen mit inaktivierten Antigenen gegeben, die sich in farbmarkierten Kavitäten auf Glas-Objekträgern befinden. Während der 30-minütigen Inkubationszeit bilden für nukleäre Antigene typische Antikörper einen Antigen-/Antikörperkomplex mit den nukleären Antigenen in den Zellen. Unspezifische Antikörper und andere freie Serumproteine werden in einem kurzen Waschvorgang entfernt. Fluoreszein-konjugiertes Antihuman-IgG von der Ziege wird dann in die Kavitäten auf dem Glas-Objekträger gegeben. Das Anti-IgG-Konjugat vermischt sich während der 30-minütigen Inkubationszeit mit Human-IgG (falls vorhanden). Nach einem kurzen Waschvorgang zur Entfernung von freiem Konjugat werden die Objekträger unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Eine positive Antikörperreaktion wird durch leuchtend grüne Fluoreszenz an den Antigenstellen charakterisiert.

Bestandteile des Testkits und Lagerbedingungen

ANA HEp2 Antigen-Objekträger: Objekträger mit HEp2 Zellen auf jeder Glaskavität. Die Objekträger sind gebrauchsfertig, sobald sie aus dem Beutel entfernt werden. Bei 2–8 °C lagern. Bei diesen Lagerbedingungen sind die Objekträger bis zum auf dem Beutel etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

ANA IgG positive Kontrolle: Jedes Fläschchen enthält 0,5 ml ANA IgG positive Humankontrolle. Diese Komponente ist eine gebrauchsfertige Flüssigkeit. Bei 2–8 °C lagern. Bei diesen Lagerbedingungen ist die flüssige positive Kontrolle bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

ANA IgG negative Kontrolle: Jedes Fläschchen enthält 0,5 ml ANA IgG negative Humankontrolle. Diese Komponente ist eine gebrauchsfertige Flüssigkeit. Bei 2–8 °C lagern. Bei diesen Lagerbedingungen ist die flüssige negative Kontrolle bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Fluoreszin-Konjugat: Jedes Fläschchen enthält 1,5 ml Fluoreszin-konjugiertes (inaktiviertes) Antihuman-IgG von der Ziege (schwere und leichte Kette) mit Evans Blue und Rhodamin Gegenfärbung. Das Fluoreszin-Konjugat ist eine Konjugation aus mithilfe von Affinitätschromatographie gereinigtem Antihuman-IgG und Fluoreszin-Iothiocyanat (FITC). Durch das Hinzufügen von Evans Blue und Rhodamin Gegenfärbung zum Konjugat wird die nicht spezifische Fluoreszenz der Gewebezellkulturen maskiert. Diese Komponente ist eine gebrauchsfertige Flüssigkeit. Bei 2–8 °C lagern. Bei diesen Lagerbedingungen ist das flüssige Konjugat bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Deckglas-Eindeckmittel: Jedes Fläschchen enthält 2,0 ml phosphatgepuffertes Glycerol mit Verblassungsschutz. Diese Komponente ist eine gebrauchsfertige Flüssigkeit. Lagertemperatur: Kühlenschrank bis Zimmertemperatur (2–30 °C). Bei diesen Lagerbedingungen ist das Eindecksiegel bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): Jedes versiegelte aluminierte Päckchen mit Pulverpuffer reicht für 1 Liter 1x PBS aus. Lagertemperatur: Kühlenschrank bis Zimmertemperatur (2–30 °C). Den gesamten Inhalt eines PBS-Päckchens in 1 Liter frisch zubereitetes destilliertes oder deionisiertes Wasser geben. Hinweis: Schnelles Umrühren beim Hinzugeben der Salze erleichtert die Solubilisierung. PBS-Lösung bei 2–8 °C aufbewahren.

Spezielles Löschkpapier: Saugfähiges Löschkpapier hat vorgestanzte Löcher zum Trocknen der Objekträgermaske. Lagertemperatur: Kühlenschrank bis Zimmertemperatur (2–30 °C).

Zusätzlich erforderliche Materialien

- Reagenzgläser, Gestelle, Pipetten, Mikrotiterplatten und Sicherheits-Pipettenvorrichtungen zur Herstellung der Probenverdünnungen.
- Inkubator, 37 °C
- Feuchte Kammer zur Inkubation der Objekträger
- Objekträgergestell und Färbeschale zum Waschen der Objekträger
- Deckgläser: 22 x 50 mm, Glas Stärke 1

Fluoreszenzmikroskop: Ein Fluoreszenzmikroskop mit folgender Ausrüstung wurde zur Kalibrierung von Kontrollen und Konjugat verwendet:

- 10x Okular
- 16x oder 40x Objektiv
- Epi-Illuminator mit 50-W-Halogenlampe
- FITC-Erregerfilter KP490
- Gelb-Absorptionsfilter K530
- Rot-Sperrfilter BG38

Die Erregungsspitze der Fluoreszein-Markierung liegt bei 490 nm und die Emissionsspitze bei 520 nm. Unterschiede in Endpunkt-Reaktivität und Fluoreszenz-Intensität können auf Art und Zustand der im jeweiligen Labor verwendeten Fluoreszenzgeräte zurückzuführen sein.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

IFA-Testkit: Kein US-Standard für Stärke. Nur zur *In-vitro-Diagnostik* vorgesehen.

- Alle Komponenten des Kits bei der empfohlenen Lagertemperatur aufbewahren. **Nicht einfrieren.**
- Komponenten nicht verwenden, wenn das Verfallsdatum überschritten ist.
- SCIMEDX stellt alle aktiven Komponenten in jeder Charge der SCIMEDX IFA-Kits als eine optimierte Einheit zusammen. Komponenten von verschiedenen Chargen oder Quellen dürfen nicht zusammen verwendet werden.
- Die Kontrollen und das Konjugat enthalten 0,095 % Natriumazid, das in Blei- bzw. Kupferleitungen explosive Verbindungen bilden kann, wenn es sich ansammelt. Wenn derartige Stoffe im Abfluss entsorgt werden, gründlich nachspülen.
- Verwenden Sie getrennte Pipette Tips für jede Probe und Reagenz zu treffen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Reagenzien geprüft werden sollen auf Anzeichen von Bakterien- oder Pilzbefall.

Antigen-Objekträger: Die Zellen auf allen IFA Antigen-Objekträgern sind fixiert und enthalten kein lebensfähiges infektiöses Material. Gute Laborpraxis (GLP) erfordert jedoch die gleiche umsichtige Handhabung und Entsorgung der Objekträger wie bei allen anderen potenziellen biologischen Gefahrstoffen im Labor.

- Die Objekträger erst kurz vor Gebrauch aus dem Schutzbeutel nehmen.
- Die mithilfe von Assays anderer Hersteller bestimmte Konzentration von Anti-ANA in bestimmten Proben kann aufgrund von Unterschieden in Assay-Methoden und Reagenz-Spezifität variieren.
- Nicht wiederverwenden Objekträger.

Humankontrollen: Die Humankontrollen in diesen Kits wurden alle mit von der FDA zugelassenen Methoden auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) und auf Antikörper gegen das humane Immunschwäneivirus (HIV) getestet und für nicht reaktiv befunden. Kein Testsystem kann jedoch die Abwesenheit dieser Erreger garantieren. Daher sind alle Humanserumkomponenten, einschließlich der Proben, die Ihr Labor zum Testen erhält, als potenzielle biologische Gefahrstoffe zu handhaben. Richtlinien hierzu siehe Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 1993.

Xn – gefährlicher Stoff

Sicherheitsvorkehrungen für Kontrollen und Konjugat:

Die Natriumazid-Konzentration in diesen Komponenten ist als gefährlich klassifiziert und unterliegt den folgenden Gefahrenhinweisen: „Gesundheitsschädlich beim Verschlucken“ und „Entwickelt bei Berührung mit Säure hochgiftige Gase“.

Komponente	ICS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Sicherheitshinweis Prävention: P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen. P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz
Piktogramm		ragen. Antwort: P305+P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen.. Weiter spülen.
Signalwort	ACHTUNG	P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz
Gefahrenhinweis	H319 Verursacht schwere Augenreizung.	P337+P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/Ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Entnahme, Lagerung und Einschränkungen der Testproben

- Das mit aseptischer Technik entnommene Serum von den roten Blutkörperchen trennen und einfrieren (~10 °C oder kälter), bis es getestet wird. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Empfehlungen zur Entnahme und Aufbewahrung von Blutproben wurden vom NCCLS aufgestellt: Approved Standard - Procedures for Handling and Processing of Blood Specimens, H18A.
- Frische flüssige Serumproben können bei Bedarf maximal eine Woche lang bei 2–8 °C aufbewahrt werden, ohne dass die Aktivität der Antikörper beeinträchtigt wird.
- Keine hämolytischen, lipämischen oder ikterischen Proben verwenden.
- Keine Proben verwenden, die sichtbar kontaminiert sind.
- Serumproben dürfen vor der Verwendung nicht hitzeaktiviert werden.
- Keine Antikoagulantien oder Konservierungsmittel in die Serumproben geben.

IFA-Verfahren

1. Für einen qualitativen IgG-Antikörper-Nachweis eine Screening-Lösung im Verhältnis 1:40 für jede Probe in phosphorgepuffter Kochsalzlösung herstellen. Alle Verdünnungen in einem Mindestvolumen von 0,10 ml mit phosphorgepuffter Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel herstellen.
2. Für eine semiquantitative Titrierung der Seren eine zweifache Serenverdünnung der Serumprobe in PBS herstellen. Dabei mit einer Verdünnung von 1:40 beginnen und gleiche Mengen an verdünntem Serum oder Plasma und PBS für jede Verdünnung zugeben.
3. Die Objekträger aus dem Schutzbeutel nehmen und 1 Tropfen (ca. 20 µl) der verdünnten Proben in jede Kavität geben. Ausreichend Flüssigkeit zugeben, um alle Kavitäten zu füllen. Der Inhalt der Kavitäten darf sich jedoch nicht vermischen. Hinweis: Der tägliche Testlauf erfordert je eine Kavität für die positive Kontrolle, negative Kontrolle und PBS (Konjugatkontrolle).
4. Die Objekträger 30 Minuten lang bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren.
5. Die Objekträger in einem dünnen Strahl Pufferlösung spülen. Den Strahl nicht direkt auf die Kavitäten richten.
6. Die Objekträger 10 Minuten lang waschen. Dabei die PBS-Lösung nach 5 Minuten wechseln. Die Objekträger mit dem Gestell in der Pufferlösung auf und ab bewegen.
7. Die Farbmaseke um die Kavitäten mit dem speziellen Löschkpapier abtupfen.
8. Einen Tropfen des gebrauchsfertigen Konjugats in jede Kavität geben.
9. Die Schritte 4 (Inkubation), 5 (PBS-Spülung), 6 (10-minütige PBS-Wäsche) und 7 (Abtupfen) wiederholen.
10. Das Glycerol-Eindeckmittel und das Deckglas (22 x 50 mm) anbringen.

11. Die Reaktivität bei 20–40-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachten. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die Objektträger direkt nach Abschluss des Tests untersucht werden. Für gleichwertige Ergebnisse die Objektträger versiegeln oder feucht aufbewahren, um den Feuchtigkeitsverlust des Eideckmittels zu minimieren. Im Dunkeln bei 2–8 °C aufbewahren und innerhalb von 3 Tagen die Ergebnisse ablesen. Eine positive Reaktivität kann durch eine intensive bis schwache Fluoreszenz gekennzeichnet sein. Die Fluoreszenzreaktion nach der folgenden Intensitätsskala bewerten: 4⁺ (intensiv), 3⁺ (leuchtend), 2⁺ (mäßig), 1⁺ (schwach).

Auswertung der Ergebnisse

- Eine leuchtend grüne fluoreszierende Farbung der Zellkerne in einem klaren Fluoreszenzmuster weist auf eine ANA-positive Reaktion hin. Proben, die bei einer Verdünnung von 1:40 positiv reagieren, sollten bis zur Endpunkt-Verdünnung titriert werden. In einer Titrierungsserie gilt die höchste Serumverdünnung, bei der eine Reaktion von 1+ eintritt, als Endpunkt. Folgende nukleäre Fluoreszenzmuster sind zu beobachten:

Muster	Charakteristika	Entsprechende Erkrankungen
Homogen	Diffuse Färbung des gesamten Zellkerns infolge einer Antikörperreaktion mit DNA-Nucleoprotein-Histonkomplexen (15)	Systemischer Lupus erythematoses (SLE) Rheumatoide Arthritis
Gesprenkelt	Farbflecken im gesamten Nukleus infolge von Antikörpern gegen Sm, RNP, SSA oder SSB (16, 17)	Sklerodermie Raynaud-Syndrom Sjögren-Syndrom Mischkollagenose (Sharp-Syndrom)
Nukleolar	Färbung der Nukleoli infolge von Antikörpern gegen RNA-Nukleoproteinkomplexe	Sklerodermie
Peripher	Färbung der Kernmembranen infolge von Antikörpern gegen DNA (18, 19)	Systemischer Lupus erythematoses (SLE)
Antizentromer	Färbung der zentromeren Bereiche der Chromosomen infolge einer Reaktion mit einem fest an zentromere DNA gebundenen Protein (9, 10)	CREST-Syndrom Variante progressiver Sklerodermie

- Die Abwesenheit eines spezifischen Fluoreszenzmusters im Zellkern weist auf eine ANA-negative Reaktion hin.

Bedeutung der Auswertung

Keine feststellbare Fluoreszenz der Zellkerne mit der Screening-Lösung	Probe ist negativ für IgG ANA
Spezifische positive Fluoreszenz der Zellkerne mit der Screening-Lösung oder bei höheren Verdünnungen	Probe ist positiv für IgG ANA

Qualitätskontrolle

- Zur Überprüfung der ordnungsgemäßen Funktion des Tests mindestens einmal täglich die positive und negative Kontrolle verwenden. Wenn die erwarteten Ergebnisse für die Kontrollen nicht erzielt werden, sind die Ergebnisse ungültig, und der Test muss wiederholt werden.
- Art und Alter des Fluoreszenzmikroskops sowie die Betriebsstunden der UV-Lampe können die Fluoreszenzintensität und die Titrierungs-Endpunkte bis zu einem gewissen Grad beeinflussen. Die in diesem Kit enthaltene ANA-positive Kontrolle wird in abgepackt, die eine Intensitätsreaktion von 3⁺ bis 4⁺ aufweist. Auf dem Fläschchen ist ein Titer angegeben, der als zusätzliche Prüfung für das Testsystem verwendet werden kann (siehe 1⁺ Verdünnungshinweis). Dieser ist als Kalibrator für die 3⁺ zu 4⁺ Intensitätsreaktion auf ihrem Mikroskop zu verwenden.
- Die im Kit enthaltene ANA-negative Kontrolle als Kalibrator für eine negative Reaktion mit ihrer Ausrüstung verwenden.
- Der tägliche Testlauf sollte eine PBS-Kavität anstelle einer Probe enthalten. Dies ist eine Konjugatkontrolle, mit der gewährleistet wird, dass das Konjugat nicht mit dem Zellsubstrat reagiert.
- Zusätzliche Kontrollen können gemäß den Richtlinien bzw. den Anforderungen lokaler oder staatlicher Vorschriften bzw. Zulassungsbehörden mitgeführt werden. Richtlinien zu den geeigneten Verfahren zur Qualitätskontrolle siehe NCCLS-Dokument C24-A, Internal Quality Control Testing: Principles and Definitions.

1⁺ Verdünnungshinweis

Die positive Kontrolle in diesem Kit ist bereit, einen 3⁺ und 4⁺ Fluoreszenzintensität zu bedienen und bietet, wenn getestet. Um eine Fluoreszenzintensität von 1⁺ zu erhalten, eine zweifache Verdünnung mit dem Titer herstellen, der auf dem in diesem Kit enthaltenen Fläschchen angegeben ist. Die positive Kontrolle beim ersten Gebrauch des Kits titrieren. Der beim Test erhaltene Titer kann sich aus mehreren technischen Gründen vom angegebenen Endpunkt-Titer unterscheiden. Es ist am besten, den auf dem Fläschchen angegebenen Titer zu verwenden sowie die zweifache Verdünnung direkt vor und nach dem angegebenen Titer. Für einen Endpunkt-Titer (1⁺) erzielte Ergebnisse sind normalerweise für verschiedene Labors unterschiedlich. Dies liegt an Faktoren, die die Fluoreszenzintensität beeinflussen. Diese Faktoren sind u. a.:

- die Nennleistung der UV-Lichtquelle im Mikroskop
- die Art der Lichtquelle
- das Alter der Lampe
- die Länge des optischen Pfads im Mikroskop und die Art der verwendeten optischen Filter
- die Genauigkeit der Verdünnungstechniken und die verwendete Ausrüstung

Einschränkungen des Verfahrens

- Es sollte grundsätzlich nicht nur ein einzelner serologischer Nachweis als einziges Erkennungskriterium verwendet werden. Alle verfügbaren klinischen und Labordaten sollten in die Diagnose einbezogen werden.
- Patienten mit SLE oder anderen Autoimmunerkrankungen können je nach klinischem Stadium der Erkrankung sehr unterschiedliche ANA-Titer aufweisen. Daher ist der ANA-Titer in der Regel nicht hilfreich bei der Unterscheidung der Krankheitszustände. Hohe ANA-Titer (1:1280 oder höher) können jedoch als Nachweis für Mischkollagenose, SLE oder Sklerodermie dienen, besonders wenn nukleolare, gesprenkelte oder periphere Färbemuster beobachtet werden.
- Es wurde festgestellt, dass verschiedene Medikamente antinukleäre Antikörper beim Patienten erzeugen können (z. B. Procainamid, Hydralazin, orale Verhütungsmittel, Diphenhydantoin, Mephenytoin und einige Antibiotika). Dies ist wichtig bei der Bestimmung des Erkrankungsnachweises.

- Geringe Titer antinukleärer Antikörper können bei gesunden Personen auftreten. Bei Personen, die gesund erscheinen, kann ANA im Serum enthalten sein. Dieser Prozentsatz nimmt mit dem Alter zu, besonders bei Personen über 60 (5, 22).
- Wenn eine Probe positive Ergebnisse für mehr als ein Muster aufweist, kann ein Muster das andere teilweise oder vollständig verdecken. In diesem Fall muss das Serum titriert werden.
- SLE-Patienten, die mit Steroiden behandelt werden, können negative Testergebnisse aufweisen.
- Dieser Test sollte an Serum durchgeführt werden. Die Verwendung an anderen Materialien wurde noch nicht untersucht.

Referenzwerte

Die Prävalenz von Antikörpern gegen ANA IgG sollte in der gesunden Population gleich Null sein. Bei asymptomatischen Personen, die gesund erscheinen, kann ANA im Serum enthalten sein. Dieser Prozentsatz nimmt mit dem Alter zu, besonders bei Personen über 60.

Um die Prävalenz von ANA bei der normalen Population zu demonstrieren, wurden Seren von 99 normalen Personen verschiedenen Alters und Geschlechts und aus verschiedenen geographischen Regionen mit dem SCIMEDXAnti-ANA IFA-Test getestet. Achtundachtzig Proben wiesen negative Ergebnisse für IgG-Antikörper gegen ANA auf (88,9%). Elf Proben wiesen positive Ergebnisse für IgG-Antikörper gegen ANA auf (11,1%).

Anti-ANA-Prävalenz bei der normalen Population

Altersgruppe	Proben gesamt	Positiv	Prävalenz
12–19	20	1	5 %
20–29	10	0	0 %
30–39	16	2	12,5 %
40–49	13	1	7,7 %
50–59	10	0	0 %
60–69	10	1	10,0 %
>70	20	6	30,0 %
Gesamt	99	11	11,1 %

Um die Prävalenz von ANA bei einer Population von SLE-Patienten nachzuweisen, wurden Seren von 100 SLE-Patienten mit dem SCIMEDXAnti-ANA IFA-Test getestet. Zweihundreunzlig Proben wiesen positive Ergebnisse für IgG-Antikörper gegen ANA auf (92%). Acht Proben wiesen negative Ergebnisse für IgG-Antikörper gegen ANA auf (8%). Leistungscharakteristika

Relative Sensitivität und Spezifität: Das PANBIO, Inc. ANA IFA-Kit wurde im Vergleich mit einem im Handel erhältlichen ANA IFA-Kit bewertet. Die Proben waren eingefrorene retrospektive Seren. Einhundert Seren stammten von Patienten, bei denen SLE diagnostiziert wurde. Neunundneunzig Seren stammten von normalen Personen unterschiedlichen Alters, Geschlechts und geographischer Herkunft. Die Gesamt-Übereinstimmung betrug 188/197 bzw. 95 %. Die untenstehende Tabelle enthält eine Zusammenfassung der Daten.

SCIMEDX ANA IFA

Alternativer IFA-Test	ANA-Status	Positiv	Negativ	Gesamt
	Positiv	100*	7	107
	Negativ	2	88	90
	Gesamt	102	95	197

*98/100 positive Seren weisen bei beiden Assays das gleiche Muster auf. 2/100 Proben wiesen unterschiedliche Muster auf.

Bitte beachten Sie, dass sich der Begriff „relativ“ auf den Vergleich der Ergebnisse dieses Assays mit denen eines ähnlichen Assays bezieht. Es wurde nicht versucht, die Ergebnisse des Assays mit der Anwesenheit oder Abwesenheit der Krankheit zu korrelieren. Die Vorhersagegenauigkeit des Vergleichsassays für die Krankheit kann nicht beurteilt werden.

Titer-Übereinstimmung: Fünfzwanzig positive Seren wurden nacheinander zweifach verdünnt und der Endpunkt-Titer wurde mit dem SCIMEDXANA IFA-Test sowie einem im Handel erhältlichen ANA IFA-Test bestimmt. Folgende Ergebnisse wurden für den Endpunkt-Titer erzielt:

Identischer Titer 12/25

± eine zweifache Verdünnung 11/25

± zwei zweifache Verdünnungen 2/25

Reproduzierbarkeit: Drei positive Seren mit verschiedenen Titern (1:80, 1:640, 1:2560) und ein negatives Serum wurden nacheinander verdünnt und jede Probe wurde dreimal mit drei verschiedenen Assays getestet und der Endpunkt bestimmt. Alle Endpunkt-Titer lagen innerhalb der Spezifikationen für ± eine zweifache Verdünnung. Siehe folgende Tabelle.

Identischer Titer 35/36

± eine zweifache Verdünnung 1/36

Echtheitstabilität: Die Echtheitstabilität der Komponenten des Kits wurde mindestens 24 Monate lang in Abständen von 6 Monaten getestet. Die Endpunkt-Titer der positiven und negativen Kontrollen wurden mit den anfänglichen Endpunkt-Titern verglichen. Akzeptabel sind Endpunkt-Titer innerhalb einer zweifachen Verdünnung voneinander. Diese Ergebnisse lagen innerhalb der Spezifikationen.

Echtheitstabilität

Objektträger-Charge	Kontrolle	Anfänglicher Endpunkt-Titer	Endpunkt-Titer nach 24 Monaten
Nr. 1	Positiv	1:1280	1:1280
	Negativ	-	-
Nr. 2	Positiv	1:1280	1:640
	Negativ	-	-
Nr. 3	Positiv	1:1280	1:640
	Negativ	-	-

SCIMEDX CORPORATION
53 Richbenton Rd
Dover, NJ 07801 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8796
www.scimedx.com

EC	REP
----	-----

Medimark Europe
11, rue Zola – BP 2332
F-38033 Grenoble Cedex 2 - France





Saggio di fluorescenza indiretta per la determinazione di anticorpi IgG antinucleari (ANA) su HEp2

Per uso *diagnostico in vitro*.

I-ANA01G 120 Tests

Uso previsto

Il saggio di fluorescenza indiretta (IFA) SCIMEDX Corp. per la determinazione dell'anticorpo IgG antinucleare (ANA) su HEp2 è destinato alla rilevazione qualitativa e semiquantitativa degli anticorpi IgG (immunglobuline G) antinucleari nel siero umano. La rilevazione degli ANA in campioni umani può aiutare la diagnosi delle malattie autoimmuni del tessuto connettivo.

Introduzione e riepilogo delle procedure d'analisi

Le malattie autoimmuni sistemiche sono caratterizzate da una varietà di autoanticorpi specifici per le molecole citoplasmatiche e nucleari coinvolte nella replicazione del DNA, nella trascrizione del DNA e nella traduzione dell'RNA messaggero (mRNA). Gli autoanticorpi sono prodotti a causa di uno squilibrio nel normale sistema di immunoregolazione, che molto probabilmente è dovuto ad agenti infettivi (1–3). Le manifestazioni dell'autoimmunità sistematica sono dovute sia agli effetti diretti di questi autoanticorpi sia al deposito antigeno-anticorpo (1).

Gli autoanticorpi circolanti nel siero contro gli antigeni nucleari (ANA) sono presenti in varie malattie, quali lupus eritematoso sistematico (SLE), artrite reumatoide, lupus eritematoso discoidale, sclerodermia, sindrome di Sjögren, malattia epatica, colite ulcerosa e miastenia grave. Circa il 5 % degli individui con i sintomi della malattia presentano livelli significativi di ANA (4,5).

La tecnica di immunofluorescenza indiretta (IFA) di Coons (6) è stata adattata al test degli ANA da Friou (7,8) ed è diventato il metodo di scelta per l'analisi e la quantificazione degli ANA (9). L'utilizzo di una coltura tissutale, HEp2, come substrato, fornisce un chiaro spettro dei pattern di colorazione nucleare, non disponibili con altri substrati, che possono essere associati a specifici stati della malattia (10–15). Inoltre la linea cellulare HEp2 è il substrato consigliato per la rilevazione dell'anticorpo anti-centromero che è particolarmente selettivo per la variante CREST della sclerosi sistemica progressiva (10).

Con i sieri della malattia reumatica si osservano comunemente pattern misti di ANA, che mostrano la presenza simultanea di molti ANA nello stesso siero (9). La tecnica IFA è molto efficace nel localizzare gli antigeni nel nucleo, nel nucleolo o nel citoplasma (9).

Principio del test

I saggi con anticorpo fluorescente SCIMEDX Corp. usano il metodo indiretto per il rilevamento degli anticorpi e la determinazione del titolo. I campioni di siero del paziente diluiti sono aggiunti alle cellule in coltura contenenti gli antigeni inattivati e fissate su pozzetti distinguibili grazie alla maschera sui vetrini per microscopia. Durante un'incubazione di 30 minuti, l'anticorpo specifico per gli antigeni nucleari forma un complesso antigeno/anticorpo con gli antigeni nucleari nelle cellule. Una breve fase di lavaggio permette di eliminare l'anticorpo non specifico e altre proteine sieriche che non hanno reagito. L'IgG anti-umana di capra coniugata con fluoresceina viene quindi applicata ai pozzetti del vetrino. Il coniugato anti-IgG si combina con le IgG umane presenti durante un'incubazione di 30 minuti. Dopo un breve lavaggio per rimuovere il coniugato che non ha reagito, i vetrini vengono osservati in microscopia a fluorescenza. La fluorescenza verde brillante nei siti degli antigeni indica una reazione positiva dell'anticorpo.

Materiali forniti e condizioni di conservazione

Vetrini dell'antigene ANA su HEp2: vetrini con cellule HEp2 su ogni pozzetto. Una volta tolti dal sacchetto di protezione, i vetrini sono pronti per l'uso. Conservare a 2–8 °C; in questa condizione di conservazione i vetrini sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del sacchetto.

Controllo positivo per IgG ANA: ogni fiala contiene 0,5 ml di controllo umano positivo per IgG ANA. Questo reagente è un liquido pronto per l'uso. Conservare a 2–8 °C; in questa condizione di conservazione il controllo positivo liquido è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala.

Controllo negativo per IgG ANA: ogni fiala contiene 0,5 ml di controllo umano negativo per IgG ANA. Questo reagente è un liquido pronto per l'uso. Conservare a 2–8 °C; in questa condizione di conservazione il controllo negativo liquido è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala.

Coniugato con fluoresceina: ogni fiala contiene 1,5 ml di IgG anti-umana di capra (inattivata) (catene pesanti e leggere) coniugata con fluoresceina con coloranti di contrasto blu Evans e rodamina. Il coniugato con fluoresceina è un complesso costituito da IgG anti-umane purificate con cromatografia per affinità e isotiocianato di fluoresceina (FITC). L'aggiunta dei coloranti di contrasto blu Evans e rodamina al coniugato maschera la fluorescenza non specifica delle cellule della coltura tissutale. Questo reagente è un liquido pronto per l'uso. Conservare a 2–8 °C; in questa condizione di conservazione il coniugato liquido è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala.

Mezzo di montaggio per vetrino coprioggetto: ogni fiala contiene 2,0 ml di glicerolo in tamponi fosfato con ritardante della dissolvenza. Questo reagente è un liquido pronto per l'uso. La temperatura di conservazione può variare tra la temperatura refrigerata e la temperatura ambiente (2–30 °C). Il mezzo di montaggio è stabile in entrambe le condizioni di conservazione fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala.

Soluzione salina in tampono fosfato (PBS): ogni confezione sigillata, rivestita in alluminio di tampone in polvere dà un litro di PBS 1X. Le temperature di conservazione possono variare tra la temperatura refrigerata e la temperatura ambiente (2–30 °C). Aggiungere l'intero contenuto di una confezione di PBS a un litro di acqua distillata o deionizzata preparata al momento. Nota: per facilitare la solubilizzazione, aggiungere i sali mentre si agita velocemente l'acqua. Conservare la PBS in soluzione a 2–8 °C.

Tamponi di carta assorbente speciali: i tamponi di carta assorbente presentano fori pretagliati da utilizzare per asciugare la maschera del vetrino. Le temperature di conservazione possono variare tra la temperatura refrigerata e la temperatura ambiente (2–30 °C).

Materiale richiesto, ma non fornito

- Provette per il test, portaprovette, pipette, piastre per microtitolazione e dispositivi di sicurezza per pipettare durante l'esecuzione delle diluizioni dei campioni
- Incubatore a 37 °C
- Camera umida per incubare i vetrini
- Porta vetrini e bacineti per il lavaggio dei vetrini
- Vetrini coprioggetto: vetrino di spessore n.1, 22 X 50 mm

Microscopio a fluorescenza: per calibrare i controlli e il coniugato è stato utilizzato un microscopio a fluorescenza attrezzato come segue:

- oculare 10x
- obiettivi 16x o 40x
- epi-illuminatore con lampada alogena da 50 W
- filtro di eccitazione per FITC KP490
- filtro di assorbimento del giallo K530
- filtro di soppressione del rosso BG38

La marcatura con fluoresceina ha un picco di eccitazione a 490 nm e un picco di emissione a 520 nm. Differenze nelle reattività dell'endpoint e nelle intensità di fluorescenza possono essere dovute al tipo e alla condizione dell'attrezzatura per fluorescenza utilizzata nel laboratorio.

Prec cauzioni generali

Kit per il test IFA: nessuno standard di potenza U.S. Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.

- Conservare ogni componente del kit alle temperature suggerite o raccomandate. **Non congelare.**
- Non utilizzare i componenti dopo la data di scadenza indicata su ognuno di essi.
- SCIMEDX ottimizza tutti i componenti attivi in ogni lotto dei kit IFA come unità. Non mischiare componenti di diversi lotti o di diversi produttori.
- I controlli e il coniugato contengono sodio azide allo 0,095 % che, quando accumulato, può formare composti esplosivi a livello delle tubature in piombo o in rame. Per eliminare questi materiali, far scorre abbondante acqua.
- Separate le punte della pipetta per ogni campione e dei reagenti per evitare la contaminazione incrociata.
- I reattivi devono essere controllati per la prova di contaminazione batterica o fungina.

Vetrini dell'antigene: tutti i vetrini dell'antigene per l'IFA hanno cellule fissate che non contengono agenti infettivi vitali. Comunque le buone pratiche di laboratorio (GLP) richiedono un'attenta manipolazione ed eliminazione dei vetrini, come con ogni altro materiale di laboratorio a rischio biologico.

- Non rimuovere i vetrini dal loro sacchetto protettivo fino al momento dell'uso.
- La concentrazione riportata dell'anti-ANA in un dato campione determinata con saggi di diversi produttori può variare a causa delle differenze dei metodi di analisi e della specificità dei reagenti.
- Non riutilizzare vetrini con substrate.

Controlli di materiale umano: i controlli di materiale umano in questi kit sono stati testati e trovati negativi per l'antigene di superficie dell'epatite B (HbsAg) e per l'anticorpo contro il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) con i metodi approvati dall'FDA. In ogni caso nessun sistema di analisi può assicurare l'assenza di questi agenti. Manipolare tutti i componenti del siero umano, inclusi quelli ricevuti nel laboratorio per il test, come potenzialmente a rischio biologico. Per le linee guida fare riferimento a Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 1993.

Xn-Sostanza nociva

Prec cauzioni di sicurezza per i controlli e il coniugato

La concentrazione di sodio azide in questi composti è classificata come "nociva" e soggetta alla seguente frase di rischio: "Nocivo per inalazione e a contatto con gli acidi libera gas molto tossici."

Componente	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Consiglio di prudenza Prevenzione:
Pittogramma		P264 Lavare accuratamente ... dopo l'uso. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
AVVERTENZA	ATTENZIONE	Risposta: P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciaccuare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciaccuare. P337+P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
Indicazione di Pericolo	H319 Provoca grave irritazione oculare.	

Raccolta dei campioni, conservazione e limiti dei campioni del test

- Separare asetticamente il siero raccolto dagli eritrociti e conservarlo congelato (a –10 °C o a temperature inferiori) fino al momento dell'analisi. Evitare di congelare e scongelare più volte. Per le raccomandazioni riguardanti la raccolta e la conservazione dei campioni di sangue consultare la pubblicazione del NCCLS, Approved Standard – Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18A.
- Se si desidera, si possono conservare i campioni di siero liquidi freschi a 2–8 °C per una settimana, senza perdita dell'attività anticorpale.
- Non utilizzare campioni emolizzati, lipemici o itterici.
- Non utilizzare campioni visibilmente contaminati.
- I campioni di siero non devono essere inattivati al calore prima dell'uso.
- Non aggiungere anticoagulanti o conservanti ai campioni di siero.

Procedura di IFA

1. Per la determinazione qualitativa di anticorpi IgG, preparare una diluizione di analisi di 1:40 in PBS per ogni campione da testare. Preparare tutte le diluizioni in un volume minimo di 0,10 ml con PBS, come diluente.
2. Per la titolazione semiquantitativa dei sieri, eseguire due diluizioni seriali dei campioni di siero in PBS a partire da una diluizione di 1:40, aggiungendo volumi equivalenti di siero o plasma diluito e PBS per ogni diluizione consecutiva.
3. Togliere i vetrini dal sacchetto protettivo e applicare 1 goccia (circa 20 µl) di campione o campioni diluiti da analizzare per ogni pozzetto. Aggiungere volume sufficiente a coprire completamente ogni pozzetto, ma evitando di mischiare i contenuti dei diversi pozzetti. Nota: ogni esecuzione del test durante la giornata richiede un pozzetto per il controllo positivo, uno per il controllo negativo e uno per la PBS (controllo del coniugato).
4. Incubare i vetrini in una camera umida per 30 minuti a 37 °C.
5. Risciacquare i vetrini con un flusso delicato di tampone, evitando di dirigere il flusso direttamente sui pozzetti.
6. Lavare i vetrini per 10 minuti cambiando la soluzione di PBS dopo 5 minuti. Agitare i vetrini muovendo il portavetrini su e giù nel tampone.
7. Asciugare la maschera colorata che circonda i pozzetti del test con gli speciali tamponi di carta assorbente.
8. Applicare una goccia del coniugato pronto per l'uso a ogni pozzetto del test.

9. Ripetere i passaggi 4 (incubazione), 5 (risciacquo con PBS), 6 (lavaggio di 10 minuti in PBS) e 7 (asciugatura).
10. Applicare il mezzo di montaggio a base di glicerolo e il vetrino coprioggetto da 22 x 50 mm.
11. Osservare la reattività in microscopia a fluorescenza usando l'ingrandimento 20-40X. Per ottenere risultati migliori, esaminare i vetrini immediatamente dopo la conclusione del test. Per ottenere risultati equivalenti, sigillare i vetrini o conservarli in ambiente umido per evitare la disidratazione del mezzo di montaggio, conservare al buio a 2-8 °C e leggere entro 3 giorni. La reattività positiva può dare un'intensità di fluorescenza che varia dal brillante a tenue. Classificare la reazione di fluorescenza secondo la seguente scala di intensità: 4⁺ (brillante), 3⁺ (luminosa), 2⁺ (moderata), 1⁺ (tenue).

Interpretazione dei risultati

- La colorazione dei nuclei delle cellule con una fluorescenza verde luminosa in un chiaro pattern di fluorescenza indica una reazione ANA-positiva. I campioni positivi a una diluizione di 1:40 devono essere titolati alla diluizione dell'endpoint. In una sequenza di titolazione, l'endpoint è rappresentato dalla diluizione più alta del siero che dimostra una reazione 1⁺. Di seguito sono descritti i pattern di fluorescenza nucleare osservabili.

Pattern	Caratteristiche	Malattie associate
Omogeneo	Colorazione diffusa all'intero nucleo, dovuta agli anticorpi che hanno reagito con i complessi DNA-nucleoproteina-istone (15).	SLE Artrite reumatoide
Punteggiato	Macchie di colorazione in tutto il nucleo, dovute agli anticorpi anti-Sm, -RNP, -SSA o -SSB (16,17).	Sclerodermia Sindrome di Raynaud Sindrome di Sjögren Collagenopatia
Nucleolare	Colorazione delle membrane nucleolari dovuta agli anticorpi contro complessi RNA-nucleoproteina (10).	Sclerodermia
Periferico	Colorazione delle membrane nucleari dovuta agli anticorpi anti-DNA (18,19).	SLE
Anti-centromerico	Colorazione delle regioni centromeriche dei cromosomi, dovuta alla reazione con una proteina saldamente legata al DNA centromerico (9,10).	Sindrome di CREST Variante della sclerosi sistematica progressiva

- L'assenza di un pattern di fluorescenza specifico associato al nucleo cellulare indica una reazione ANA-negativa.

Importanza dell'interpretazione

Non si riscontra alcuna fluorescenza distinguibile dei nuclei cellulari alla diluizione di analisi.	Il campione del test è negativo per le IgG ANA.
Si riscontra fluorescenza specifica positiva dei nuclei cellulari alla diluizione di analisi o a diluizioni più alte.	Il campione del test è positivo per le IgG ANA.

Controllo di qualità

1. Per assicurare che il test funzioni in modo corretto utilizzare i controlli positivo e negativo almeno una volta per ogni analisi di una giornata. Se non si ottengono i risultati attesi per i controlli, i risultati non sono validi e il test deve essere ripetuto.
2. Il tipo e l'età del microscopio a fluorescenza e le ore di utilizzo del bulbo UV possono influire sull'intensità della fluorescenza e sugli endpoint della titolazione. Il controllo positivo per gli ANA fornito con questo kit dà una reazione con intensità 3⁺-4⁺. La fiala ha un titolo elencato per l'utilizzo come ulteriore controllo del sistema di analisi (vedere la nota per la diluizione 1⁺). Utilizzarla come calibratore della reazione a intensità da 3⁺ a 4⁺ con il microscopio in uso.
3. Utilizzare il controllo negativo per gli ANA fornito con questo kit come calibratore per una reazione negativa con l'attrezzatura in uso.
4. Ogni test della giornata deve includere un pozzetto con PBS al posto del campione del test. Questo rappresenta il controllo del coniugato per assicurare che il coniugato non reagisca con il substrato cellulare.
5. Possono essere analizzati ulteriori controlli in base alle linee guida o alle richieste delle normative locali, nazionali o federali oppure delle organizzazioni per l'accreditamento. Come guida per le corrette pratiche di controllo di qualità, consultare il documento del NCCLS C24-A, Internal Quality Control Testing: Principles and Definitions.

Nota per la diluizione 1⁺

Il controllo positivo in questo kit è un liquido pronto per l'uso per dare un'intensità di fluorescenza da 3⁺ a 4⁺, quando testato. Per ottenere un'intensità di fluorescenza pari a 1⁺, diluire due volte il titolo indicato sulla fiala inclusa in questo kit. Titolare il controllo positivo quando si utilizza un nuovo kit.

Il titolo ottenuto può differire dal titolo di endpoint indicato per varie ragioni tecniche. È meglio testare il titolo indicato sulla fiala e anche la doppia diluizione subito prima e subito dopo il titolo indicato. È normale che i risultati ottenuti per un titolo di endpoint (1⁺) differiscano tra i laboratori a causa di fattori che influiscono sull'intensità di fluorescenza, quali:

1. la potenza della sorgente della luce UV nel microscopio
2. il tipo di sorgente luminosa
3. l'età della lampada
4. la lunghezza del percorso ottico del microscopio e i tipi di filtri ottici utilizzati
5. l'accuratezza delle tecniche di diluizione e l'attrezzatura per la diluizione.

Limits della procedura

1. Nessuna singola determinazione sierologica può essere utilizzata come unico criterio di analisi. Per elaborare una diagnosi devono essere inclusi tutti i dati clinici e di laboratorio disponibili.
2. I pazienti con SLE o altre malattie autoimmuni possono mostrare un'ampia variazione nei titoli degli ANA in base allo stadio clinico della malattia. Ne consegue che il titolo degli ANA non è sempre utile per distinguere gli stadi della malattia. Titoli elevati di ANA (1:1280 o superiori) possono comunque fornire evidenza di MCTD, SLE o sclerodermia, soprattutto se si osservano pattern di colorazione nucleolare, punteggiata o periferica.
3. È stato riportato che numerosi farmaci terapeutici inducono gli anticorpi antinucleari nei pazienti (ad es. procainamide, idralazina, anticoncezionali per uso orale, difenilidantoina, mefenitoina e alcuni antibiotici). Quando si valuta l'evidenza della malattia, è importante considerare questa informazione.

4. Nei sieri di individui normali è possibile trovare bassi titoli di anticorpi antinucleari. I sieri di individui apparentemente sani possono contenere ANA. Questa percentuale aumenta con l'età, in particolar modo dopo i 60 anni (5,22).
5. Se un campione è positivo per più di un pattern, uno di essi può nascondere parzialmente o completamente gli altri. In questo caso è necessario titolare il siero.
6. I pazienti affetti da SLE e trattati con steroidi possono dare risultati negativi.
7. Il saggio deve essere eseguito su siero; non è stato stabilito l'uso su altre matrici.

Valori attesi

Ci si aspetta che la prevalenza di anticorpi IgG ANA nella popolazione normale sia zero. In ogni caso, il siero di individui apparentemente sani e asintomatici può contenere ANA. Questa percentuale aumenta con l'età, in particolar modo dopo i 60 anni. Per dimostrare la prevalenza degli ANA in una popolazione normale, sono stati testati 99 sieri di individui normali di varie età e genere, provenienti da diverse aree geografiche con il test IFA anti-ANA PANBIO. Ottantotto campioni sono risultati negativi per gli anticorpi IgG ANA (88,9 %). Undici campioni sono risultati positivi per gli anticorpi IgG ANA (11,1 %).

Prevalenza di anticorpi anti-ANA nella popolazione normale

Gruppo di età	Campioni totali	N. positivi	Prevalenza
12-19	20	1	5 %
20-29	10	0	0 %
30-39	16	2	12,5 %
40-49	13	1	7,7 %
50-59	10	0	0 %
60-69	10	1	10,0 %
>70	20	6	30,0 %
Totale	99	11	11,1 %

Per dimostrare la prevalenza degli ANA nei sieri di una popolazione affetta da SLE, sono stati testati 100 pazienti con SLE con il test IFA anti-ANA PANBIO. Novantadue campioni sono risultati positivi per gli anticorpi IgG ANA (92 %). Otto campioni sono risultati negativi per gli anticorpi IgG ANA (8 %).

Caratteristiche prestazionali

Sensibilità e specificità relative: il test IFA per la determinazione degli ANA SCIMEDX Corp. è stato valutato rispetto a un test IFA per la determinazione degli ANA disponibile sul mercato. I campioni erano sieri retroattivi congelati. Cento sieri provenivano da pazienti con diagnosi di SLE. Novantuno sieri provenivano da individui sani di varie età, genere e area geografica. La concordanza totale era 188/197 o del 95 %. La tabella seguente riepiloga i dati.

IFA per la determinazione degli ANA PANBIO

IFA alternativo	Stato degli ANA	Positivi	Negativi	Totale
	Positivi	100*	7	107
	Negativi	2	88	90
	Totale	102	95	197

*98 sieri positivi su 100 mostravano lo stesso pattern nei due saggi. 2 campioni su 100 mostravano pattern diversi.

Si deve notare che "rispetto a" è riferito al confronto dei risultati di questo saggio con quelli di un saggio simile. Vi è stato un tentativo di correlare i risultati del saggio con la presenza o l'assenza della malattia; non può essere espresso alcun giudizio sull'accuratezza del saggio di confronto nella predizione della malattia.

Concordanza del titolo: venticinque sieri positivi sono stati diluiti due volte serialmente ed è stato determinato il titolo di endpoint con il test IFA per la determinazione degli ANA SCIMEDX e un test IFA per la determinazione degli ANA disponibile sul mercato. I risultati del titolo di endpoint sono i seguenti:

Titolo identico	12/25
± una, doppia diluizione	11/25
± due, doppia diluizione	2/25

Riproducibilità: tre sieri positivi con vari titoli (1:80, 1:640, 1:2560) e un siero negativo sono stati diluiti serialmente e testati tre volte ognuno con tre diversi saggi ed è stato determinato l'endpoint. Tutti i titoli di endpoint erano all'interno delle specifiche di ± una, doppia diluizione. Consultare la tabella seguente.

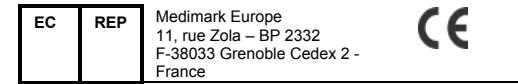
Titolo identico	35/36
± una, doppia diluizione	1/36

Stabilità in tempo reale: l'analisi della stabilità in tempo reale dei componenti del kit è stata eseguita a intervalli di 6 mesi per un minimo di 24 mesi. I titoli di endpoint dei controlli positivo e negativo sono stati confrontati con i titoli di endpoint al rilascio. I criteri di accettabilità sono i titoli di endpoint entro una doppia diluizione per tutti e due. Questi risultati rientravano nelle specifiche.

Stabilità in tempo reale

Lotto del vetrino	Controllo	Titolo di endpoint al rilascio	Titolo di endpoint a 24 mesi
#1	Positivo	1:1280	1:1280
	Negativo	-	-
#2	Positivo	1:1280	1:640
	Negativo	-	-
#3	Positivo	1:1280	1:640
	Negativo	-	-

 SCIMEDIX CORPORATION
53 Richbenton Rd
Dover, NJ 07801 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8796
www.scimedix.com



Ensayo de fluorescencia indirecta para anticuerpos antinucleares (ANA) IgG HEp2

Para uso diagnóstico *in vitro*.

I-ANA01G 120 Tests

Uso previsto

El ensayo de fluorescencia indirecta (IFA) de SCIMEDX para anticuerpos antinucleares (ANA) IgG HEp2, se utiliza para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos antinucleares IgG (immunoglobulina G) en suero humano. La detección de ANA en seres humanos puede utilizarse como ayuda en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes del tejido conectivo.

Introducción y resumen de los protocolos del ensayo

Las enfermedades sistémicas autoinmunes se caracterizan por una diversidad de autoanticuerpos específicos para las moléculas nucleares y citoplásmicas implicadas en el replicado de DNA, transcripción de DNA e interpretación de RNA mensajero (mRNA). Los autoanticuerpos son el resultado de un desequilibrio en la red immunorreguladora natural, muy probablemente causado por agentes infecciosos (1-3). Las manifestaciones de la autoinmunidad sistémica se deben a los efectos directos de estos autoanticuerpos o a la deposición antígeno-anticuerpo (1).

Los autoanticuerpos del suero circulantes frente a los抗igenos nucleares (ANA) se manifiestan en diversas enfermedades tales como lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide, lupus discoides, esclerodermia, síndrome de Sjögren, hepatopatías, colitis ulcerante y miastenia gravis. Aproximadamente el 5 % de la población sin síntomas patológicos tiene niveles significativos de ANA (4,5).

La técnica de fluorescencia indirecta para anticuerpos (IFA) de Coons (6) fue adaptada a los ensayos ANA por Friou (7,8). Desde entonces, se ha convertido en el método preferido para el análisis y la cuantificación de ANA (9). El uso de un sustrato de cultivo de tejidos, HEp2, proporciona un claro espectro de patrones de tinción nuclear no disponible con otros sustratos, y que puede estar asociado con estados patológicos específicos (10-15). Además, la línea celular HEp2 es el sustrato recomendado para la detección de anticuerpos anticitrónmeros, que son altamente selectivos para la variante CREST de la esclerosis sistémica progresiva (10).

Los patrones mezclados de ANA pueden observarse normalmente con los sueros de enfermedades reumáticas, reflejando la existencia simultánea de varios ANA en el mismo suero (9). La técnica IFA es muy eficaz en la localización de抗igenos en el núcleo, núcleolo o citoplasma (9).

Principio del ensayo

Los ensayos de anticuerpos fluorescentes de SCIMEDX utilizan el método indirecto de detección de anticuerpos y determinación de títulos. Las muestras de suero de paciente diluidas se aplican a las células cultivadas que contienen抗igenos inactivados proporcionados en pocillos delineados con pintura en portaobjetos de vidrio. Durante una incubación de 30 minutos, el anticuerpo específico para抗igenos nucleares forma un complejo抗igeno/anticuerpo con los抗igenos nucleares en las células. El anticuerpo no específico y otras proteínas de suero sin reaccionar se eliminan mediante un breve lavado. A continuación, se aplica anti-IgG humana de cabra conjugada con fluoresceína a los pocillos del portaobjetos de vidrio. El conjugado anti-IgG se combina con la IgG humana, si está presente, durante una incubación de 30 minutos. Tras un breve lavado para eliminar el conjugado no reaccionado, los portaobjetos se observan mediante microscopía de fluorescencia. Una reacción positiva de los anticuerpos se indica mediante fluorescencia verde brillante en los puntos de los抗igenos.

Material suministrado y condiciones de almacenamiento

Portaobjetos de antígeno ANA HEp2: Portaobjetos de células HEp2 en cada pocillo de vidrio. Los portaobjetos están listos para su uso tras haberlos retirado de su bolsa protectora. Almacenar a 2-8 °C. A esta temperatura, los portaobjetos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la bolsa.

Control positivo ANA IgG: Cada vial contiene 0,5 ml de control positivo humano ANA IgG. Este componente es un líquido listo para usar. Almacenar a 2-8 °C. A esta temperatura, el control positivo líquido es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

Control negativo ANA IgG: Cada vial contiene 0,5 ml de control negativo humano ANA IgG. Este componente es un líquido listo para usar. Almacenar a 2-8 °C. A esta temperatura, el control negativo líquido es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

Conjugado de fluorescencia: Cada vial contiene 1,5 ml de anti-IgG humana de cabra conjugada con fluoresceína (inactivada) (cadena pesada y ligera) con azul de Evans y contratinaciones de rodamina. El conjugado de fluorescencia es una conjugación de anti-IgG humana purificada por cromatografía por afinidad con isoficocianato de fluoresceína (FITC). La adición de azul de Evans y contratinaciones de rodamina al conjugado oculta la fluorescencia inespecífica de las células de cultivo de tejidos. Este componente es un líquido listo para usar. Almacenar a 2-8 °C. A esta temperatura, el conjugado líquido es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

Medio de montaje del cubreobjetos: Cada vial contiene 2,0 ml de glicerol tamponado con fosfato, con un retardador de decoloración. Este componente es un líquido listo para usar. La temperatura de almacenamiento puede oscilar entre refrigeración y temperatura ambiente (2-30 °C). El medio de montaje es estable a cualquiera de estas temperaturas hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

Solución salina tamponada con fosfato (PBS): Con cada paquete de aluminio sellado de tampón liofilizado se puede preparar un litro de 1X PBS. Las temperaturas de almacenamiento pueden oscilar entre refrigeración y temperatura ambiente (2-30 °C). Añadir todo el contenido de un paquete de PBS a 1 litro de agua destilada o desionizada, recién preparada. Nota: Remover rápidamente el agua mientras se añaden las sales para facilitar la disolución. Almacenar la PBS como solución a 2-8 °C.

Absorbentes especiales: Los absorbentes tienen orificios precortados para utilizar en el secado de la máscara del portaobjetos. Las temperaturas de almacenamiento pueden oscilar entre refrigeración y temperatura ambiente (2-30 °C).

Material adicional necesario

- Probetas, gradillas, pipetas, placas de microtitulación y dispositivos de seguridad para pipeteo para la dilución de las muestras
- Incubador a 37 °C
- Cámaras húmedas para la incubación de portaobjetos
- Gradilla para el soporte de portaobjetos y plato de tinción para el lavado de portaobjetos

- Cubreobjetos: 22 X 50 mm, vidrio de grosor nº 1

Microscopio de fluorescencia: Para calibrar los controles y el conjugado se utilizó un microscopio de fluorescencia equipado con lo siguiente:

- Ocular de 10X
- Objetivos de 40X o 40X
- Epi-iluminador con lámpara halógena de 50 W
- Filtro de excitación de FITC KP490
- Filtro absorbente del amarillo K530
- Filtro de supresión del rojo BG38

El marcador de fluorescina tiene un pico de excitación de 490 nm y un pico de emisión de 520 nm. Las diferencias en las reactividades de punto de referencia y en las intensidades de fluorescencia pueden deberse al tipo y condición del equipo de fluorescencia utilizado en el laboratorio.

Precauciones generales

Kit de ensayo IFA: Sin estándar de potencia en EE.UU. Sólo para uso diagnóstico *in vitro*.

- Almacenar todos los componentes del kit a sus temperaturas recomendadas o sugeridas. **No congelar.**
- No utilizar los componentes una vez rebasada la fecha de caducidad indicada.
- SCIMEDX optimiza todos los componentes activos de cada lote de sus kits IFA como unidad. No mezclar componentes de lotes u orígenes diferentes.
- Los controles y el conjugado contienen un 0,095 % de azida sódica cuya acumulación puede formar compuestos explosivos en las tuberías de plomo y/o cobre. Si este material se desecha por el desagüe, dejar correr el agua abundantemente por el mismo.
- Use distintas puntas de pipeta para cada una de las muestras y reactivos para evitar la contaminación cruzada.
- Los reactivos deben inspeccionarse en busca de evidencias de contaminación bacteriana o micótica.

Portaobjetos de antígeno: Todos los portaobjetos de antígeno IFA tienen células fijadas que no contienen ningún agente infeccioso viable. Sin embargo, las buenas prácticas de laboratorio (BPL) indican que hay que tener tanto cuidado en la manipulación y desecho de los portaobjetos, como con cualquier otro material de laboratorio potencialmente biopeligroso.

- No extraer los portaobjetos de su bolsa protectora hasta el momento de utilizarlos.
- La concentración indicada de anti-ANA en una muestra específica, determinada mediante ensayos de diferentes fabricantes, puede variar a causa de las diferencias en los métodos de ensayo y en la especificidad de los reactivos
- No reutilizar portaobjetos.

Controles de procedencia humana: En todos los controles de procedencia humana de estos kits se ha estudiado la presencia de anticuerpos frente al抗igeno de superficie del virus de la hepatitis B (HbsAg) y al virus de inmunodeficiencia humana (VIH) mediante métodos homologados por la FDA, encontrándose todos ellos no reactivos. Sin embargo, ningún sistema de prueba puede garantizar la ausencia de estos agentes. Manipular todos los componentes de suero humano, incluyendo aquellos recibidos en su laboratorio para ser sometidos a pruebas, como si fueran potencialmente biopeligrosos. Para directrices sobre este tema, consultar el manual de Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1993.

Xn - Sustancia dañina

Precaución de seguridad con los controles y el conjugado:

La concentración de azida sódica en estos componentes se clasifica como Nociva y está sujeta a la siguiente frase de riesgo: "Nocivo por ingestión. En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos".

Componente	CS001 PBS Powder Packets O-GLB01Y Mounting Medium	Consejos de prudencia Prevención:
Pictograma		P264 Lavarse ... concientadamente tras la manipulación. P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Respuesta: P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Indicación de Peligro H319 Provoca irritación ocular grave. P337+P313 Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.
Palabra Clave	ATENCIÓN	
Indicación de Peligro	H319 Provoca irritación ocular grave.	

Recogida de las muestras, almacenamiento y limitaciones de las muestras analizadas

Separar asepticamente el suero recogido de los hematíes y almacenar en congelación (-10 °C o menos) hasta el momento del ensayo. Evitar congelar y descongelar repetidas veces. La NCCLS proporciona unas recomendaciones sobre la recogida y el almacenamiento de las muestras de sangre, en su publicación Approved Standard – Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18-A.

Si así se desea, las muestras de suero líquido fresco se pueden almacenar a 2-8 °C hasta una semana, sin pérdida de actividad de los anticuerpos.

No utilizar muestras hemolizadas, lipémicas o con ictericia.

No utilizar muestras que presenten evidencia de contaminación.

Las muestras de suero no deben inactivarse por calor antes de su uso.

No añadir anticoagulantes ni conservantes a las muestras de suero.

Protocolo IFA

1. Para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG, preparar una dilución de análisis de 1:40 de cada muestra en PBS. Preparar todas las diluciones con un volumen mínimo de 0,10 ml, con PBS como diluyente.
2. Para la titulación semicuantitativa de sueros, preparar diluciones de serie dobles de la muestra de suero en PBS, empezando con una dilución de 1:40, y añadiendo volúmenes iguales de suero diluido o plasma y PBS para cada dilución consecutiva.
3. Extraer los portaobjetos de su bolsa protectora y aplicar 1 gota (aproximadamente 20 µl) de la(s) muestra(s) a cada pocillo. Añadir suficiente volumen para cubrir completamente cada pocillo, pero sin dejar que se mezclen los contenidos de los diferentes pocillos. Nota: El proceso de análisis de cada día requiere un pocillo para el control positivo, uno para el control negativo y otro para el PBS (control de conjugado).
4. Incubar los portaobjetos en una cámara húmeda durante 30 minutos a 37 °C.
5. Aclarar los portaobjetos con un ligero chorro de tampón. Evitar dirigir el chorro hacia los pocillos.
6. Lavar los portaobjetos durante 10 minutos, cambiando la solución de PBS después de 5 minutos. Agitar los portaobjetos moviendo la gradilla hacia arriba y hacia abajo en el tampon.
7. Absorber la máscara de pintura que rodea los pocillos utilizando los absorbentes especiales.
8. Aplicar a cada pocillo una gota de conjugado listo para su uso.

9. Repetir los pasos 4 (incubación), 5 (aclarado con PBS), 6 (lavado de 10 minutos con PBS) y 7 (absorción).
10. Aplicar el medio de montaje de glicerol y un cubreobjetos de vidrio de 22 X 50 mm.
11. Observar la reactividad bajo microscopía de fluorescencia con una ampliación de 20–40X. Para obtener óptimos resultados, examinar los portaobjetos inmediatamente después de terminar el ensayo. Para obtener resultados equivalentes, sellar los portaobjetos o mantenerlos húmedos para minimizar la deshidratación del medio de montaje, almacenarlos en la oscuridad a 2–8 °C, y leerlos antes de los tres días. La intensidad de fluorescencia de la reactividad positiva puede oscilar de brillante a débil. Evaluar la reacción de fluorescencia según la siguiente escala de intensidad: 4+ (muy brillante), 3+ (brillante), 2+ (moderada), 1+ (débil).

Interpretación de los resultados

La tinción fluorescente verde brillante de los núcleos de las células en un patrón de fluorescencia clara, indica una reacción ANA positiva. Las muestras positivas a una dilución de 1:40 deben ser tituladas a la dilución del punto de referencia. En una serie de titulación, la dilución de suero más alta que demuestra una reacción 1+ se interpreta como el punto de referencia. Los patrones observables de fluorescencia nuclear son:

Patrón	Características	Enfermedades asociadas
Homogéneo	Tinción difusa de todo el núcleo debido a la reacción de anticuerpos frente a complejos DNA-nucleoproteína-histona (15).	LES Artritis reumatoide
Con lunares	Lunares de tinción en todo el núcleo debido a anticuerpos frente a Sm, RNP, SSA o SSB (16,17).	Esclerodermia Síndrome de Raynaud Síndrome de Sjögren Enfermedad mixta del tejido conectivo
Nucleolar	Tinción de las membranas nucleolares debido a anticuerpos frente a complejos RNA-nucleoproteína (10).	Esclerodermia
Periférico	Tinción de las membranas nucleolares debido a anticuerpos frente a DNA (18,19).	LES
Anticentromero	Tinción de las zonas centroméricas de los cromosomas debido a reacción con una proteína estrechamente ligada al DNA centromérico (9,10).	Síndrome CREST Variante de esclerosis sistémica progresiva

La ausencia de un patrón fluorescente específico asociado con el núcleo celular indica una reacción ANA negativa.

Significación de la interpretación

No se ha encontrado fluorescencia discernible del núcleo celular en la dilución de análisis.	La muestra es IgG ANA negativa.
Se ha encontrado fluorescencia positiva específica del núcleo celular en la dilución de análisis o en diluciones más altas.	La muestra es IgG ANA positiva.

Control de calidad

1. Para asegurarse de que el ensayo funciona correctamente, utilizar los controles positivo y negativo al menos una vez en las pruebas de cada día. Si no se cumple el resultado esperado de los controles, los resultados no son válidos y deberá repetirse el ensayo.
2. El tipo y antigüedad del microscopio de fluorescencia y las horas de uso de la bombilla UV pueden afectar hasta cierto punto a la intensidad de la fluorescencia y a los puntos de referencia de la titulación. El control ANA positivo suministrado con este kit indica una reacción de intensidad de 3+ a 4+. El vial tiene un título listado que puede utilizarse como comprobación adicional del sistema de ensayo (ver Notificación de dilución 1+). Utilizarlo como calibrador de una reacción de intensidad de 3+ a 4+ en el microscopio.
3. Utilizar el control ANA negativo suministrado con este kit como calibrador de una reacción negativa en el equipo.
4. El ensayo de cada día deberá incluir un pocillo con PBS en lugar de una muestra. Este control de conjugado se utiliza para asegurarse de que el conjugado no reacciona con el sustrato celular.
5. Es posible analizar controles adicionales siguiendo las directrices o los requisitos de las normativas locales, regionales o nacionales, o de las organizaciones acreditadas. Consultar las recomendaciones de la NCCLS sobre las prácticas adecuadas de control de calidad en el documento C24-A, Internal Quality Control Testing: Principles and Definitions.

Notificación de dilución 1+

El control positivo suministrado con este kit es un líquido listo para usar que proporciona una intensidad de fluorescencia de 3+ a 4+ al ser analizado. Para obtener una intensidad de fluorescencia 1+, realice diluciones dobles al título indicado en el vial que se incluye en este kit. Titular el control positivo con el uso inicial de este kit.

El título que obtenga con el ensayo puede diferir del título de punto de referencia listado, debido a varias razones técnicas. Es mejor analizar el título indicado en el vial, así como la dilución doble, inmediatamente antes y después del título listado. Es normal que los resultados obtenidos para un título de punto de referencia (1+) difieran entre laboratorios debido a factores que afectan a la intensidad de fluorescencia. Estos factores son:

1. la potencia nominal de la fuente de luz UV del microscopio
2. el tipo de fuente de luz
3. la antigüedad de la lámpara
4. la longitud de la trayectoria óptica del microscopio y los filtros ópticos utilizados
5. la precisión de las técnicas de dilución y el equipo de dilución

Limitaciones del protocolo

1. No debe utilizarse ninguna determinación serológica simple como único criterio para la detección. Deben incluirse todos los datos clínicos y de laboratorio disponibles, para fines de diagnóstico.
2. Los pacientes con LES u otros fenómenos autoinmunes pueden manifestar amplias variaciones de títulos ANA según la etapa clínica de la enfermedad. Por tanto, un título ANA generalmente no es útil para distinguir los estados de la enfermedad. Los títulos altos de ANA (1:1280 o superiores), sin embargo, pueden proporcionar evidencia de EMTC, LES o esclerodermia, especialmente si se observan patrones de tinción nucleolar con lunares o periférica.
3. Se ha informado que varios fármacos terapéuticos inducen anticuerpos antinucleares en pacientes (p. ej. procainaamida, hidralazina, contraceptivos orales, difenilhidantoina, mfenitoína y algunos antibióticos). Es importante considerar esta información al determinar la evidencia de enfermedad.

4. Los títulos bajos de anticuerpos antinucleares pueden encontrarse en los sueros de individuos normales. Individuos aparentemente sanos pueden tener ANA en su suero. Este porcentaje aumenta con la edad, particularmente pasada la sexta década de la vida (5,22).
5. Si una muestra es positiva en varios patrones, uno de ellos puede ocultar otro parcial o totalmente. En esta circunstancia, será necesaria la titulación del suero.
6. Las pruebas de los pacientes con LES tratados con esteroides pueden producir resultados negativos.
7. El ensayo debe realizarse con suero. No se ha establecido su uso con otras matrices.

Resultados esperados

Se espera que la prevalencia de anticuerpos IgG frente a ANA en la población normal sea nula. Sin embargo, algunos individuos aparentemente sanos y asintomáticos pueden tener ANA en su suero. Este porcentaje aumenta con la edad, particularmente pasada la sexta década de la vida.

Para demostrar la prevalencia de ANA en una población normal, se analizaron los sueros de 99 individuos normales de varias edades y géneros, procedentes de diversas zonas geográficas, mediante el método IFA anti-ANA de SCIMEDX. Ochenta y ocho muestras fueron negativas para anticuerpos IgG frente a ANA (88,9 %). Once muestras fueron positivas para anticuerpos IgG frente a ANA (11,1 %).

Prevalencia anti-ANA en una población normal

Grupo de edad	Nº de muestras	Positivo	Prevalencia
12–19	20	1	5 %
20–29	10	0	0 %
30–39	16	2	12,5 %
40–49	13	1	7,7 %
50–59	10	0	0 %
60–69	10	1	10,0 %
>70	20	6	30,0 %
Total	99	11	11,1 %

Para demostrar la prevalencia de ANA en una población de pacientes con LES, se analizaron los sueros de 100 individuos con LES mediante el método IFA anti-ANA de SCIMEDX. Noventa y dos muestras fueron positivas para anticuerpos IgG frente a ANA (92 %). Ocho muestras fueron negativas para anticuerpos IgG frente a ANA (8 %).

Características de funcionamiento

Sensibilidad relativa y especificidad: Se evaluó el kit IFA ANA de SCIMEDX, Inc. contra un método IFA ANA disponible en el mercado. Las muestras estaban formadas de suero congelado retrospectivo. Cien sueros procedían de pacientes con LES. Noventa y nueve sueros procedían de personas normales de varias edades, géneros y zonas geográficas. La concordancia general fue de 188/197 o del 95 %. Los datos se resumen en la siguiente tabla.

IFA ANA de SCIMEDX

IFA alternativo	Estado ANA	Positivo	Negativo	Total
	Positivo	100*	7	107
Negativo	2	88	90	
Total	102	95	197	

*98/100 sueros positivos mostraron el mismo patrón en los dos ensayos. 2/100 muestras indicaron patrones diferentes.

Hay que tener en cuenta que "relativa" se refiere a la comparación de los resultados de este ensayo con los de un ensayo similar. No se ha intentado correlacionar los resultados del ensayo con la ausencia o la presencia de enfermedad. No se puede juzgar la exactitud de la comparación de los ensayos para predecir la enfermedad.

Concordancia de titulaciones: Se diluyeron 25 sueros positivos en serie y por duplicado, determinándose el título de punto de referencia con IFA ANA de SCIMEDX y con un IFA ANA disponible en el mercado. Los resultados de título de punto de referencia son los siguientes:

Título idéntico	12/25
± una, dilución doble	11/25
± dos, diluciones dobles	2/25

Reproductibilidad: Tres sueros positivos con varios títulos (1:80, 1:640, 1:2560) y un suero negativo se diluyeron en serie y se analizaron tres veces cada uno en tres diferentes ensayos, y se determinó el punto de referencia. Todos los títulos de punto de referencia estuvieron dentro de las especificaciones de ± una dilución doble. Consultar la siguiente tabla.

Título idéntico	35/36
± una, dilución doble	1/36

Estabilidad en tiempo real: El ensayo de estabilidad en tiempo real de los componentes del kit se llevó a cabo en intervalos de 6 meses durante un mínimo de 24 meses. Se compararon los títulos de punto de referencia de los controles positivo y negativo con los títulos de punto de referencia en el momento de su lanzamiento. Los criterios de aceptación son títulos de punto de referencia dentro de una dilución doble entre ellos. Estos resultados estuvieron dentro de las especificaciones.

Estabilidad en tiempo real

Lote de portaobjetos	Control	Título de punto de referencia al lanzamiento	Título de punto de referencia a los 24 meses
Nº 1	Positivo	1:1280	1:1280
	Negativo	-	-
Nº 2	Positivo	1:1280	1:640
	Negativo	-	-
Nº 3	Positivo	1:1280	1:640
	Negativo	-	-

 SCIMEDX CORPORATION
53 Richbenton Rd
Dover, NJ 07801 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8796
www.scimedx.com

EC	REP
----	-----

Medimark Europe
11, rue Zola – BP 2332
F-38033 Grenoble Cedex 2 - France



	Manufactured by Prodotto da Fabricado por Fabriqué par hergestellt von
REF	Catalog number Número de catalogo Número de Catálogo Numéro de catalogue Katalognummer
LOT	Lot Lotto Lote Lot Charge
EC REP	EC Authorized Representative Rappresentante Autorizzato CE Representante Autorizado CE CE Représentant autorisé EG autorisierter Bevollmächtigter
CE	EC Declaration of Conformity Dichiarazione di Conformità CE Declaración de Conformidad CE CE Déclaration de Conformité EG Konformitätserklärung
	Number of tests Número di test Número de determinaciones Nombre de tests Anzahl der Teste
	See instructions for use Vedere le istruzioni per l'uso Consultar la instrucciones de uso Voir instructions Gebrauchsweisung beachten
	Expiration date Data di scadenza Caducidad Date d'Expiration Haltbarkeitsdatum
	Store at 2-8 °C / 35-46 °F Conservare a 2-8°C/35-46 F Almacenar a 2-8°C / 35-46°F Conserver à 2-8°C Bei 2-8°C / 35-46°F lagern
	Caution Attenzione Precaución Précautions Achtung
	Xn-Harmful Substance. Refer to Material Safety Data Sheet Substance nocive (Xn). Voir la fiche sur la sécurité des équipements. Xn – gefährlicher Stoff Siehe Sicherheitsdatenblatt. Xn-Sostanza nociva. Fare riferimento alla Scheda di sicurezza. Xn - Sustancia dañina. Consultar la Hoja de Datos de Seguridad del Material.
	Potential biological risk Potenziale rischio biologico Riesgo potencial biológico Biohazard Potentielle biologische Gefährdung
RFU	Ready for use Pronto all'uso Listo para su uso Prêt à l'emploi Gebrauchsfertig

IVD	For in vitro diagnostic use Per uso diagnostico <i>in vitro</i> Para uso solo <i>in vitro</i> Usage <i>in vitro</i> Für in-vitro diagnostische Verwendung
RUO	For research use only Solo per ricerca Para uso solo en investigación Pour recherche Nur für Forschungszwecke
IUO	For investigational use only Solo per uso investigativo Para uso solo en investigación Pour investigation Nur für Forschungszwecke
PBS	Phosphate Buffered Saline Tampone salino fosfato Fosfato Salino Tamponado Tampon phosphate saline PBS
MS	Mounting Solution, Buffered Glycerol Solution de montage, glycérol tamponné Eindeckmittel, gepuffertes Glycerol Soluzione di montaggio, glicerolo tamponato Solución de montaje, glicerol tamponado
AG SLD	Antigen Slide Lames d'antigène Antigen-Objekträger: Vetrino dell'antigene Portaobjetos de antígeno
FITC	Anti-Human Conjugate with counterstain Conjugué anti-humain avec coloration de contraste Antihuman-Konjugat mit Gegenfärbung Conjugado anti-umano con colorante de contraste Conjugado anti-humano con contratinación
NEG	Negative Control Controllo Negativo Control Negativo Contrôle negative Negative Kontrolle
POS	Positive Control Controllo Positivo Control Positivo Contrôle positif Positive Kontrolle
CONJ CNS	Counterstain Colorante di contrasto Contraste Contrecolorant Gegenfärbung
CS	Coverslip Coprioggetto Cubre portaobjetos Lamelles couvre-objet Deckgläshen
BLT	Blotters Buvards Löschkopierpapier Tamponi di carta assorbente Absorbentes
DIL	Sample Diluent Diluente del campione Diluyente de muestra Tampon de dilution Probenverdünnungslösung