AESKU.DIAGNOSTICS

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUSLIDES®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

MANUALE DI ISTRUZIONI

***AESKUSLIDES®* ANA HEp-2**

Ref 51.1xx

CE

AESKUSLIDES®
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



eIFU
WWW.AESKU.COM

MANUALE DI ISTRUZIONI

ANA HEp-2

Rif. standard	Descrizione	Test
51.100	**ANA HEp-2** (12 pozzetti)	120
51.101	**ANA HEp-2** (12 pozzetti)	120
51.100.Bulk5	**ANA HEp-2** (12 pozzetti) Bulk Kit	600
51.101.Bulk5	**ANA HEp-2** (12 pozzetti) Bulk Kit	600
51.180	**ANA HEp-2** (18 pozzetti)	180
51.181	**ANA HEp-2** (18 pozzetti)	180
51.180.Bulk5	**ANA HEp-2** (18 pozzetti) Bulk Kit	900
51.181.Bulk5	**ANA HEp-2** (18 pozzetti) Bulk Kit	900

Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim
Germany
Phone: +49 6734 9622-0
Fax: +49 6734 9622-2222
Website: www.aesku.com
Mail: info@aesku.com

Indice dei contenuti

1. USO PREVISTO 1
2. IMPIEGO CLINICO 1
3. PRINCIPIO DEL TEST 2
4. INTERPRETAZIONE 2
4.1 Pattern di fluorescenza della membrana nucleare 2
4.2 Pattern di fluorescenza nucleoplasmatica 3
4.3 Pattern di fluorescenza nucleolare 5
4.4 Pattern di fluorescenza del fuso 5
4.5 Pattern di fluorescenza citoplasmatica 6
4.6 Campione negativo 7
4.7 Fluorescenza indefinibile 8
4.8 Allegato 8
5. CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI SPECIFICHE 9
a. Tabella 1: Serie di dati combinati sugli intervalli di confidenza 9
b. Tabella 2: Confronto pattern serie di dati combinati equivalente vs. Aesku 9
5.1 Riproducibilità e accuratezza 9
6. SCHEDA DI INTERPRETAZIONE DEI DATI 10
7. CONTENUTO DEI KIT STANDARD 11
8. CONTENUTO DEI REAGENTI COMUNI 13
8.1 Reagenti comuni 13
8.2 Materiale occorrente, ma non fornito 14
9. CONSERVAZIONE E VALIDITÀ 14
10. PRECAUZIONI D'USO 15
c. Rischi per la salute 15
d. Istruzioni d'uso generali 15
11. RACCOLTA, PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI 16
12. ESECUZIONE DEL TEST 16
e. Preparazione 16
f. Procedura 17
g. Flusso di lavoro 18
13. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI 19
14. SIMBOLI NORMATIVI 20

ANA HEp-2

1. USO PREVISTO

***AESKUSLIDES*® ANA HEp-2** è un test di immunofluorescenza indiretto per la determinazione degli autoanticorpi nucleari e/o citoplasmatici nel siero umano.

Il test è indicato nella diagnosi differenziale delle malattie reumatiche sistemiche quali lupus eritematoso sistemico (LES), collagenosi miste (mixed connective tissue diseases, MCTD), sclerodermia, sindrome di Sjögren, polimiosite e dermatomiosite.

2. IMPIEGO CLINICO

Gli anticorpi anti-nucleo (ANA) sono diretti contro molteplici antigeni nucleari e citoplasmatici e compaiono con elevata frequenza nelle malattie reumatiche sistemiche. Pertanto, la determinazione di tali anticorpi è un importante ausilio nella diagnosi differenziale. Infatti, ad esempio, gli anticorpi anti-SS-A (Ro) e anti-SS-B (La) sono associati al LES e alla sindrome di Sjögren (SS), mentre gli anticorpi anti-dsDNA e anti-Sm e gli anticorpi contro gli istoni e contro i nucleosomi sono associati al LES (lupus eritematoso sistemico). Gli anticorpi anti-RNP sono associati alle collagenosi miste e al LES, gli anticorpi anti-Scl-70 ala sclerodermia (sclerosi sistemica progressiva, SSP), gli anticorpi anti-Jo-1 a polimiosite e dermatomiosite e gli anticorpi diretti contro le proteine del centromero alla sindrome CREST. Per informazioni dettagliate vedere la sezione 4 di seguito.

Per la determinazione degli ANA, il metodo di prima scelta è stato finora il test di immunofluorescenza indiretto (IF) su cellule eucariote come HeLa e Hep2 . L'IF è un metodo sensibile, ma l'analisi di un gran numero di sieri è laboriosa. Inoltre, il metodo è soggetto a un certo margine di errore dovuto all'interpretazione dei risultati da parte del personale di laboratorio e alle differenze tra i microscopi a fluorescenza. La specificità dei singoli ANA può essere stabilita tramite ELISA che utilizzano gli antigeni specifici. In tal modo è possibile una differenziazione agevole e più affidabile degli ANA in base alla loro specificità.

Antigene: cellule HEp-2

Reattività crociata: Non sono note reazioni crociate

Il rilevamento degli anticorpi è basato sul principio dell'immunofluorescenza indiretta (IIFA). I vetrini portaoggetto sono rivestiti di sezioni tessutali o cellule (cellule HEp-2 per la determinazione degli ANA, granulociti per la determinazione degli ANCA o *Crithidia luciliae* per la determinazione degli anticorpi anti-nDNA). Se il siero del paziente contiene anticorpi diretti contro componenti dei tessuti o delle cellule, tali anticorpi si legano al substrato fissato sul vetrino durante la prima incubazione. Dopo la rimozione del materiale non legato nella fase di lavaggio, gli anticorpi legati vengono rilevati grazie al legame con immunoglobuline anti-umane coniugate con fluorescina durante la seconda incubazione. La specifica fluorescenza verde del complesso antigene-anticorpo viene quindi esaminata al microscopio a fluorescenza.

3. PRINCIPIO DEL TEST

Per istruzioni dettagliate, fare riferimento alla procedura di test descritta del capitolo 12 del manuale comune. Per i kit ANA HEp-2 verranno utilizzati i seguenti dettagli:

- Tempo di colorazione contatore: da 30 a 90 secondi
- Titolo di screening consigliato:
  - 1:80 per campioni di adulti
  - 1:40 per campioni pediatrici.

4. INTERPRETAZIONE

Le cellule HEp2 sono cellule epiteliali umane coltivate da un carcinoma laringeo umano. Il substrato garantisce una crescita cellulare omogenea senza ponti cellulari. Per l'analisi dei campioni è importante utilizzare cellule in mitosi, per poter determinare con maggiore precisione i pattern di fluorescenza nucleare.

Il titolo finale è la diluizione del siero con la quale si osserva ancora una fluorescenza positiva.

L'analisi deve sempre essere condotta con un controllo positivo e un controllo negativo. Una fluorescenza debole dei nuclei con titoli di 1:40 (bambini) e 1:80 (adulti) oppure un'incertezza riguardo ai dati clinici devono essere verificate con i controlli. In tal caso, raccogliere i campioni approssimativamente ogni 6 settimane e analizzarli in modo analogo. [1]

4.1 Pattern di fluorescenza della membrana nucleare

4.1.1 Lieve fluorescenza della membrana nucleare

Lieve fluorescenza omogenea anulare della membrana nucleare nelle cellule in interfase. In alcuni campioni con anticorpi forti si ha l'impressione di una colorazione dell'intero nucleo. Un pattern simile si osserva nelle cellule in telofase. Nelle cellule in metafase la fluorescenza appare diffusa nel citoplasma e il materiale cromosomico non è fluorescente.

4.1.2 Fluorescenza discontinua della membrana nucleare

Una fluorescenza interrotta lungo la membrana nucleare. Con una messa a fuoco attraverso il nucleo è possibile osservare la fluorescenza discontinua sulla superficie del nucleo intatto.

Un pattern simile si osserva in telofase. Nelle cellule in metafase la fluorescenza si distribuisce diffusamente nel citoplasma. In alcuni campioni con anticorpi forti si ha l'impressione di una colorazione dell'intero nucleo.

[1] Wiik A. Scand J Rheumatol 2005; 34:260-8.

4.2 Pattern di fluorescenza nucleoplasmatica

4.2.1 Fluorescenza nucleare omogenea

Una fluorescenza uniforme diffusa in tutto il nucleoplasma, talvolta più evidente nelle aree periferiche, può essere correlata a diversi anticorpi, generalmente diretti contro componenti cromosomiche (DNA, istoni ecc.). In alcuni casi si osserva una fluorescenza più marcata nella regione interna del nucleo (orlo nucleare).

In alcuni campioni può essere inoltre osservata una fluorescenza periferica dei nucleoli. La fluorescenza dei nucleoli è variabile. In metafase si osserva una colorazione omogenea o una colorazione della cromatina.

Si distinguono i seguenti pattern di fluorescenza leggermente differenti:

- fluorescenza nucleare omogenea con colorazione omogenea dei nucleoli
- fluorescenza nucleare omogenea senza colorazione dei nucleoli

4.2.2 Fluorescenza nucleare punteggiata

Esiste una serie di pattern punteggiati del nucleo, difficilmente distinguibili tra di loro. Con la dovuta attenzione si possono distinguere sette pattern di fluorescenza. I cromosomi in metafase sono negativi in sei dei sette pattern, mentre sono positivi nel cosiddetto pattern del centromero.

4.2.3 Fluorescenza nucleare punteggiata di grandi dimensioni (matrice nucleare) (SC35)

Punteggiatura di dimensioni variabili distribuita nel nucleoplasma, definita in passato fluorescenza della matrice nucleare. Verosimilmente dovuta alla colorazione dei granuli intercromatinici. I nucleoli sono negativi. Il citoplasma in metafase e telofase mostra una punteggiatura diffusa con cromatina negativa.

4.2.4 Fluorescenza nucleare grossolanamente punteggiata

Punteggiatura fitta di dimensioni variabili, abitualmente accompagnata da punteggiatura di grandi dimensioni, distribuita nel nucleoplasma delle cellule in interfase. I nucleoli sono negativi. Il citoplasma delle cellule in metafase e telofase mostra una punteggiatura addensata intorno alla cromatina, mentre la cromatina stessa rimane negativa.

Questo pattern di fluorescenza è generalmente associato a una colorazione degli spliceosomi.

4.2.5 Fine punteggiatura nucleare

Colorazione finemente punteggiata a distribuzione uniforme, talvolta molto fitta, che può far apparire il pattern quasi omogeneo. I nucleoli possono essere positivi (in particolare con anticorpi anti-SS-B/La) o negativi. Il citoplasma delle cellule in metafase mostra una fine punteggiatura addensata intorno alla cromatina, mentre la cromatina stessa rimane negativa. I nucleoli delle cellule in telofase possono essere positivi, con colorazione talvolta più intensa rispetto alle cellule in interfase.

4.2.6 Fluorescenza granulare di tipo Scl 70

Fine punteggiatura granulare uniforme del nucleoplasma e delle aree cromosomiche nelle cellule in metafase e telofase, spesso con nucleoli positivi in evidenza. A basso ingrandimento, la colorazione può apparire omogenea. Questo pattern non si osserva unicamente nei sieri positivi per anti-Scl 70.

4.2.7 Punteggiatura nucleare pleomorfa

I nuclei delle cellule in fase di proliferazione (fase S) mostrano molteplici tipi di punteggiatura del nucleoplasma, da fine a notevolmente grossolana e irregolare (a seconda della preparazione può essere interessato il 10-50% delle cellule). In alcune cellule sono positivi anche i nucleoli. La cellule in riposo (fase G) e in metafase rimangono negative. Questo tipo di fluorescenza è detto anche pattern anti-PCNA (anti-proliferating cell nuclear antigen) e si osserva generalmente in associazione con altri pattern.

4.2.8 Fluorescenza centromerica

Punteggiatura distinta pressoché uniforme, distribuita nell'intero nucleo (40-60 punteggiature per nucleo). Le cellule in telofase e metafase mostrano sempre tale punteggiatura nel materiale cromosomico condensato. Questo pattern è dovuto agli anticorpi diretti contro i cinetocori dei cromosomi, che possono riconoscere diverse proteine centromeriche (CENP-A, B, C, D, E).

4.2.9 Dot nucleari multipli (NSp-1)

5-10 puntini (dot) per nucleo. La colorazione interessa le strutture nucleari comunemente dette corpuscoli PML (per via della loro marcata comparsa nella leucemia promielocitica). I cromosomi in metafase e telofase rimangono negativi.

4.2.10 Coiled dots nucleari (alcuni dot nucleari)

2-6 dot per nucleo, localizzati nel nucleoplasma. Spesso situati nelle immediate vicinanze dei nucleoli. La cromatina in metafase e telofase è negativa.

4.3 Pattern di fluorescenza nucleolare

4.3.1 Fluorescenza nucleolare omogenea

Fluorescenza dell'intero nucleolo senza colorazione dei cromosomi o della regione organizzatrice del nucleolo (NOR) nelle cellule in divisione.

4.3.2 Fluorescenza nucleolare granulare

Granuli chiari, addensati, di grandi dimensioni, appartenenti ai centri fibrillari dei nucleoli. Nelle cellule in mitosi, la piastra metafasica e telofasica sembra presentare una fluorescenza irregolare a ventaglio.

4.3.3 Fluorescenza nucleolare interrotta

Piccoli granuli separati, situati in particolare al centro dei nucleoli. Nelle cellule in metafase si possono osservare 2-5 punteggiature distinte all'interno del corpo cromatinico, appartenente alla regione organizzatrice del nucleolo.

4.4 Pattern di fluorescenza del fuso

4.4.1 Fluorescenza dei centrioli (centrosoma)

Nei fusi in metafase si osservano punteggiature fluorescenti distinte in corrispondenza dei poli del fuso, situate perpendicolarmente tra di loro.

Nelle cellule in interfase si rilevano una o due punteggiature chiare nel citoplasma, in prossimità del nucleo.

4.4.2 Fluorescenza dei poli del fuso (NuMA)

Fluorescenza dei poli del fuso nelle cellule in metafase (pattern triangolare o a forma di banana). Le fibre del fuso sono negative, con un pattern più lineare nelle cellule in telofase. Una fine punteggiatura con nucleoli negativi si osserva generalmente nelle cellule in riposo e in telofase, che però possono anche essere negative.

4.4.3 Fluorescenza delle fibre del fuso

Colorazione dell'intero apparato del fuso, dal polo alle masse di cromatina, nelle cellule in metafase. Cromosomi negativi nelle cellule in riposo o in divisione.

4.4.4 Fluorescenza midbody (MSA-2)

Nelle cellule in profase e metafase, la fluorescenza si presenta con fini strie nella regione cromosomica, perpendicolari al fianco della piastra metafasica. In telofase, la fluorescenza è limitata alla linea di divisione e a un sottile corpo di congiunzione (midbody) tra le cellule in procinto di completare la mitosi. Le cellule in fase S e G2 mostrano una punteggiatura discreta o disomogenea. Questo pattern è dovuto agli anticorpi diretti contro antigene MSA-2 (mitotic spindle antigen 2).

4.4.5 C Fluorescenza C-F

Caratteristica osservata in cellule in metafase, con due gruppi di fitti granuli grossolani che circondano come un'impugnatura la piastra metafasica, con aspetto simile a una cerniera lampo. I granuli sono parte dei centromeri. Il citoplasma circostante presenta una colorazione diffusa. Nelle cellule in profase si osserva un addensamento interrotto in corrispondenza dei cromosomi. In alcune cellule in interfase si può osservare una finissima e fitta punteggiatura nucleare. Questo pattern è dovuto agli anticorpi diretti contro antigene MSA-3 (mitotic spindle antigen 3), che può essere identico alla proteina centromerica F (CENP-F).

4.5 Pattern di fluorescenza citoplasmatica

4.5.1 Fine punteggiatura citoplasmatica

Fini granuli distribuiti nell'intero citoplasma. Spesso si presentano più limpidi nella periferia cellulare, dove formano un quadro simile a una nebulosa. I nuclei e i nucleoli sono negativi. Questo pattern è caratteristico degli anticorpi diretti contro le tRNA sintetasi. I cromosomi in metafase sono negativi.

4.5.2 Fluorescenza citoplasmatica diffusa

Fluorescenza finissima, fitta, granulare od omogenea oppure aspetto a nuvola, che interessa parte del citoplasma. I nuclei sono negativi, ma i nucleoli possono presentare una colorazione omogenea se gli anticorpi sono diretti contro proteine o RNA ribosomali i cui precursori sono localizzati nei nucleoli. Il materiale cromosomico delle cellule in metafase è negativo

4.5.3 Fluorescenza mitocondriale

Granuli irregolari di discrete dimensioni, disposti in un reticolo localizzato dal nucleo a citoplasma. L'antigene principale, il cluster antigenico M2, è composto da quattro proteine mitocondriali della membrana mitocondriale interna. I nuclei e i nucleoli sono negativi, ma i sieri con alti titoli anticorpali possono dare impressione di una punteggiatura del nucleo.

4.5.4 Fluorescenza lisosomiale

Fluorescenza irregolare tra i grandi organuli, distribuita nel citoplasma. Può essere dovuta ad anticorpi diretti contro piccoli organuli, quali lisosomi e perossisomi. Il nucleo è negativo, ma si osserva una colorazione diffusa del citoplasma delle cellule in divisione.

4.5.5 Fluorescenza del Golgi

Colorazione degli organuli polari in prossimità del nucleo, granuli di dimensioni irregolari. Il nucleo e i nucleoli sono negativi. Colorazione diffusa del citoplasma delle cellule in divisione, evidenziata in corrispondenza del materiale cromosomico.

4.5.6 Fluorescenza actinica

Colorazione delle fibre actiniche situate in un piano direttamente al di sotto della membrana plasmatica. Il nucleo, i nucleoli e i cromosomi in metafase sono negativi. Le fibre di actina in prossimità della membrana plasmatica si estendono lungo l'intera cellula. Si può osservare anche un'estensione dendritica sulla membrana cellulare.

4.5.7 Fluorescenza della vimentina

Grande quantità di fini fibre distribuite nell'intero citoplasma, che danno origine a un reticolo di forma stellare. Intorno al nucleo possono essere colorate alcune masse di fibre aggregate, dalla forma a spirale. I nuclei e i nucleoli sono negativi.

4.6 Campione negativo

4.6.1 Esempio 1

Il citoplasma o i nuclei non mostrano pressoché alcuna fluorescenza. Chiazze verdi singole e spesso irregolari, osservate nel campo visivo, possono essere dovute ad aggregati del coniugato. Le strutture cellulari possono apparire brune (ad es. i nucleoli), in particolare nei preparati non recenti o conservati con anti-decoloranti. Anche i detriti cellulari possono dare origine ad artefatti fluorescenti.

4.6.2 Esempio 2

Fluorescenza verdastra molto opaca dei nuclei e/o del citoplasma, di intensità inferiore a quella di un campione debolmente positivo. L'analisi di questi campioni è agevolata impiego di controlli costituiti da un campione debolmente ANA-positivo, un campione ANA-negativo e un campione fortemente ANA-positivo nei test quotidiani.

4.7 Fluorescenza indefinibile

Qualsiasi altro pattern in rapporto con organuli o strutture subcellulari non ancora integrato nella classificazione.

4.8 Allegato

I laboratori che utilizzano per la diagnostica degli ANA sezioni al criostato, ad es. fegato o rene di roditore, non sono in grado di individuare i seguenti pattern di fluorescenza: nuclei con punteggiatura pleomorfa, fluorescenza del centromero, dot nucleari multipli, coiled dots nucleari (coiled body pattern), alcuni pattern nucleolari e la maggior parte dei pattern citoplasmatici. Non sono apprezzabili neanche i pattern dell'apparato del fuso. I pattern di fluorescenza mitocondriale sono riconoscibili nella maggior parte dei tessuti come punteggiatura grossolana, in passato rilevata in sezioni tissutali di rene di animale. La debole fluorescenza della membrana nucleare è spesso ben evidente in sezioni di fegato di ratto. Il titolo limite di positività ANA in cellule HEp-2 è generalmente superiore a 1:80, nelle sezioni tissutali è normalmente inferiore.

Un siero mostra spesso diversi pattern di fluorescenza, ad es. dot nucleari multipli insieme a pattern mitocondriali (entrambi sono caratteristici della colangite biliare primaria) e la punteggiatura nucleare pleomorfa insieme a una colorazione nucleare omogenea o punteggiatura grossolana o fine (caratteristiche del lupus eritematoso sistemico). Parimenti, il pattern del centromero si osserva spesso insieme al pattern mitocondriale.

Si richiama l'attenzione sull'utilizzo, da parte di alcuni laboratori e test, di coniugati FITC diretti contro tutte le classi immunoglobuliniche. Il presente glossario è basato sui risultati ottenuti con coniugati IgG-specifici.

5. CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI SPECIFICHE

Centotrentotto campioni congelati sono stati testati con due lotti di reagenti di un'altra azienda e con due lotti di ***AESKUSLIDES***®. I 118 campioni clinici erano stati conservati per diversi anni e provenivano da pazienti sottoposti ad analisi per la diagnosi di patologie reumatiche. Sono inoltre stati aggiunti venti campioni da individui sani, che rappresentavano una popolazione priva di sintomi clinici di patologia reumatica. Il confronto fra i due kit intendeva dimostrare la comparabilità fra sistemi ANA HEp-2 di due aziende indipendenti, inclusa l'omogeneità fra pattern.

a. Tabella 1: Serie di dati combinati sugli intervalli di confidenza

		Equivalente		
		Positivo	Negativo	Totale
AESKUSLIDES® ANA HEp-2	Positivo	116	0	116
	Negativo	0	22	22
	Totale	116	22	138

% di concordanza positiva = 116/116 = 100 % (IC 95 %: 96,8 – 100 %)
% di concordanza negativa = 22/22 = 100 % (IC 95 %: 85,1 – 100 %)

b. Tabella 2: Confronto pattern serie di dati combinati equivalente vs. Aesku

Pattern	n	Equivalente	*AESKUSLIDES*®
Omogeneo	32	32	32
Punteggiato	82	82	82
Nucleolare	20	20	20
Centromerico	6	6	6
Periferico	3	3	3
Membrana nucleare	1	1	1

N =144[2]

I campioni clinici rappresentavano uno spettro completo di malattie autoimmuni, incluse LES, sclerodermia, sclerodermia C.R.E.S.T., sindrome di Sjögren, MCTD, sindrome da antifosfolipidi, artrite reumatoide, polimiosite/dermatomiosite, LES indotto da farmaci ecc.

5.1 Riproducibilità e accuratezza

Sono stati testati tre diversi LOTTI di ***AESKUSLIDES***® con 15 campioni di siero che coprivano l'intera serie di pattern. I campioni sono stati diluiti da 1:40 a 1:10240 e ogni diluizione è stata analizzata da due lettori indipendenti su tutti e tre i LOTTI. Il criterio di accettazione era una deviazione di +/- 1 punto di intensità nella fluorescenza. Tutti i campioni, tutte le diluizioni, tutti i LOTTI e tutti i lettori indipendenti sono risultati conformi ai criteri di accettazione.

Dati più approfonditi sono disponibili su richiesta.

[2] La discrepanza fra N=138 in Tabella 1 e N=144 in Tabella 2 deriva dal fatto che alcuni campioni sono del tutto privi di pattern (ad esempio il campione 5) mentre altri hanno due pattern (ad esempio il campione 2). La tabella 2 si riferisce solo al numero dei pattern.

6. SCHEDA DI INTERPRETAZIONE DEI DATI

ANA HEp-2

Data:	Lotto:
Vetrino N°:	Operatore:

Pozzetto N°	ID	Fattore di diluizione	I.F.	Cromosomi (mitosi)	Nucleoplasma	Nucleolo	citoplasma	autoanticorpi	note
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									

7. CONTENUTO DEI KIT STANDARD

		VETRINI				CONIUGATO			CONTROLLO POSITIVO		
Rif. kit	**Descrizione kit**	**Rif.**	**Pozzetti**	**Rivestito con**	**quantità**	**Rif.**	**Descrizione**	**quantità**	**Rif.**	**Descrizione**	**quantità**
51.100	**ANA HEp-2** (12 pozzetti)	**S51.100**	12	ANA-HEp-2 Cells	10	**C51.100**	IgG Tappo blu: soluzione colorata bluastra. Componente: BSA, fluoresceina (FITC) con etichetta anti-umano Anticorpo	1x 4,8 ml	**PC51.100**	Controllo fluorescenza ANA (omogeneo) Tappo rosso: soluzione incolore. Componente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1% (conservante)	1x 0,5 ml
51.101	**ANA HEp-2** (12 pozzetti)					**C51.101**	IgG Tappo blu: soluzione colorata bluastra. Componente: BSA, fluoresceina (FITC) con etichetta anti-umano Anticorpo (H+L)		**PC51.101**	Controllo fluorescenza ANA (omogeneo) Tappo rosso: soluzione incolore. Componente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1% (conservante)	1x 0,5 ml
51.100. Bulk5	**ANA HEp-2** (12 pozzetti) **Bulk kit**				50	**C51.100. Bulk**	IgG Tappo blu: soluzione colorata bluastra. Componente: BSA, fluoresceina (FITC) con etichetta anti-umano Anticorpo	2x 10 ml	**PC51.100**	Controllo fluorescenza ANA (omogeneo) Tappo rosso: soluzione incolore. Componente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1% (conservante)	1x 0,5 ml
51.101. Bulk5	**ANA HEp-2** (12 pozzetti) **Bulk kit**					**C51.101. Bulk**	IgG Tappo blu: soluzione colorata bluastra. Componente: BSA, fluoresceina (FITC) con etichetta anti-umano Anticorpo (H+L)		**PC51.101**	Controllo fluorescenza ANA (omogeneo) Tappo rosso: soluzione incolore. Componente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1% (conservante)	1x 0,5 ml

		VETRINI				CONIUGATO			CONTROLLO POSITIVO		
Rif. kit	**Descrizione kit**	**Rif.**	**Pozzetti**	**Rivestito con**	**quantità**	**Rif.**	**Descrizione**	**quantità**	**Rif.**	**Descrizione**	**quantità**
51.180	**ANA HEp-2** (18 pozzetti)	**S51.180**	18	ANA-HEp-2 Cells	10	**C51.100. Bulk**	IgG Tappo blu: soluzione colorata bluastra. Componente: BSA, fluoresceina (FITC) con etichetta anti-umano Anticorpo	1x 10 ml	**PC51.100**	Controllo fluorescenza ANA (omogeneo) Tappo rosso: soluzione incolore. Componente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.181	**ANA HEp-2** (18 pozzetti)					**C51.101. Bulk**	IgG Tappo blu: soluzione colorata bluastra. Componente: BSA, fluoresceina (FITC) con etichetta anti-umano Anticorpo (H+L)		**PC51.101**	Controllo fluorescenza ANA (omogeneo) Tappo rosso: soluzione incolore. Componente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.180. Bulk5	**ANA HEp-2** (18 pozzetti) **Bulk kit**				50	**C51.100. Bulk**	IgG Tappo blu: soluzione colorata bluastra. Componente: BSA, fluoresceina (FITC) con etichetta anti-umano Anticorpo	3x 10 ml	**PC51.100**	Controllo fluorescenza ANA (omogeneo) Tappo rosso: soluzione incolore. Componente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml
51.181. Bulk5	**ANA HEp-2** (18 pozzetti) **Bulk kit**					**C51.101. Bulk**	IgG Tappo blu: soluzione colorata bluastra. Componente: BSA, fluoresceina (FITC) con etichetta anti-umano Anticorpo (H+L)		**PC51.101**	Controllo fluorescenza ANA (omogeneo) Tappo rosso: soluzione incolore. Componente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1 % (conservante)	1x 0,5 ml

NOTA: il contenuto degli altri componenti dei kit, ad esempio reagenti comuni (controllo negativo, liquido di montaggio ecc.), è descritto di seguito nella sezione 8 CONTENUTO DEI REAGENTI.

8. CONTENUTO DEI REAGENTI COMUNI

8.1 Reagenti comuni

Rif. kit	quantità	Rif.	Reagente	Volume	Descrizione	Pronto all'uso
Tutti	1x	**NCIFA**	Controllo negativo	0,5 ml	Tappo verde: soluzione incolore. Componente: siero umano (diluito), sodio azide <0,1 % (conservante)	SÌ
Tutti	1x	*** EBIFA**	Blu Evans 0,2 %	1,5 ml	Tappo bianco: soluzione di colore blu. Componente: PBS, blu Evans. Diluire il blu Evans allo 0,2 % 1:3000 in 1 x WBIFA	NO
51.100; 51.101; 51.180; 51.181	1x	**MMIFA**	Liquido di montaggio	8 ml	Omologato per l'uso con HELMED® o HELIOS® Tappo bianco: soluzione incolore Componente: PBS, glicerina.	SÌ
51.100.Bulk5; 51.101.Bulk5; 51.180.Bulk5; 51.181.Bulk5	3x	**MMIFA.Bulk**	Liquido di montaggio	12 ml		
51.100; 51.101; 51.180; 51.181	1x	**WBIFA**	Tampone di lavaggio (10x)	100 ml	Tappo bianco: soluzione incolore Diluire 1:10 con acqua distillata il tampone concentrato (es. 100 ml + 900 ml). Contenente: PBS, sodio azide (conservante).	NO
51.100.Bulk5; 51.101.Bulk5; 51.180.Bulk5; 51.181.Bulk5	3x					
51.100; 51.101	1x	**SBIFA**	Tampone di lavaggio (1x)	70 ml	Tappo bianco: soluzione incolore per la diluizione del siero del paziente Contenente: PBS, BSA, sodio azide (conservante).	SÌ
51.100.Bulk5; 51.101.Bulk5	3x					
51.180; 51.181	1x			100 ml		
51.180.Bulk5; 51.181.Bulk5	3x					

Le quantità si riferiscono al singolo kit. (*) devono essere ordinati separatamente

8.2 Materiale occorrente, ma non fornito

1. Acqua distillata
2. Provette da test per la diluizione dei campioni
3. Beuta
4. Pipetta volumetrica
5. Timer
6. Microscopio a fluorescenza con sistema FITC (filtro di eccitazione 490 nm, filtro di sbarramento 510 nm)
7. Camera umida
8. Cuvetta
9. Puntali
10. Coprioggetto (24 x 60 mm)
11. spremere flacone di lavaggio

Se le informazioni sul prodotto, etichette incluse, risultassero mancanti o inesatte contattare il produttore o il fornitore del kit.

9. CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare tutti i reagenti a 2–8 °C / 35,6–46,4 °F al riparo dalla luce intensa. La data di scadenza di ciascun componente è riportata sulla rispettiva etichetta. Non usare i reagenti dopo la data di scadenza.

Conservare tutti i reagenti e i vetrini a 2-8 °C / 35,6-46,4 °F nel contenitore originale. Dopo la preparazione, le soluzioni sono stabili per almeno una settimana a 2-8 °C / 35,6-46,4 °F.

I reagenti e i vetrini devono essere usati entro la data di scadenza indicata su ciascun componente.

10. PRECAUZIONI D'USO

c. Rischi per la salute

QUESTO PRODOTTO È DESTINATO ESCLUSIVAMENTE ALL'USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Il kit deve essere utilizzato solo da parte di personale esperto e specificamente addestrato nelle metodiche di diagnostica in vitro. Il presente prodotto non è considerato tossico o pericoloso in condizioni di utilizzo conforme all'uso previsto; tuttavia, per garantire la massima sicurezza, si rimanda a quanto segue

Raccomandazioni e precauzioni

Il kit contiene componenti potenzialmente nocivi. Benché i reagenti del kit non siano classificati come irritanti per gli occhi e la cute, si raccomanda di evitare il contatto con gli occhi e con la cute e di indossare guanti monouso.

Tutti i materiali di origine umana utilizzati per alcuni reagenti del presente kit (ad es. i controlli) sono stati testati con metodi approvati e sono risultati negativi per HBsAg, epatite C e HIV. Tuttavia, nessun test può garantire con assoluta certezza l'assenza di agenti virali in tali materiali. Pertanto, i reagenti di controllo del kit e i campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infettivi e maneggiati in accordo con le normative nazionali.

Il kit contiene materiale di origine animale (BSA, Immunoglobuline) come indicato nella tabella dei contenuti, gestire in base alle esigenze nazionali.

d. Istruzioni d'uso generali

1. Non pipettare con la bocca. Non fumare, mangiare o bere durante l'utilizzo del kit.
2. Non mescolare o sostituire reagenti di lotti differenti, perché ciò può alterare i risultati.
3. Dopo l'uso, chiudere con cura tutti i flaconi, per evitare contaminazioni batteriche.
4. Pipettare sempre tutte le soluzioni con nuovi puntali sterili.
5. Non esporre i componenti a temperature superiori a 37 °C / 98,6 °F. (tranne MMIFA)
6. Durante l'intera procedura, non lasciar asciugare i pozzetti dei vetrini.
7. Non congelare i vetrini.

Ogni laboratorio dovrebbe determinare i propri valori di riferimento in base alle proprie metodiche, ai propri controlli, alle attrezzature impiegate e alla popolazione di pazienti.

La diagnosi clinica definitiva non deve basarsi esclusivamente sui risultati del test condotto, ma anche sulla valutazione di tutti i referti clinici e di laboratorio da parte del medico.

Nel caso in cui i valori dei controlli non corrispondano ai criteri, il test non è valido e va ripetuto. Eseguire i seguenti controlli: le date di scadenza dei reagenti (preparati), le condizioni di magazzinaggio, le pipette, i dispostivi, il fotometro, le condizioni di incubazione e i metodi di lavaggio.

Nel caso in cui i risultati dei seguenti controlli non presentino alcun valore anormale o alcun tipo di deviazione, rivolgersi al produttore o al fornitore del test kit.

11. RACCOLTA, PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Utilizzare preferibilmente campioni di siero freschi. Il prelievo di sangue deve avvenire in conformità con le normative nazionali. Effettuare i prelievi di sangue in condizioni asettiche.

I campioni lipemici, itterici, emolitici o contaminati con batteri possono causare interferenze.

Eventuali particelle presenti nel siero devono essere eliminate tramite centrifugazione a bassa velocità (<1000 x g). I campioni di sangue devono essere raccolti in provette pulite, asciutte e vuote. Dopo la separazione, i campioni di siero devono essere utilizzati immediatamente durante le prime otto ore, conservati ben chiusi a 2-8 °C / 35,6-46,4 °F per un massimo di 2 settimane oppure congelati a -20 °C / -4 °F per periodi più lunghi. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente i campioni.

12. ESECUZIONE DEL TEST

e. Preparazione

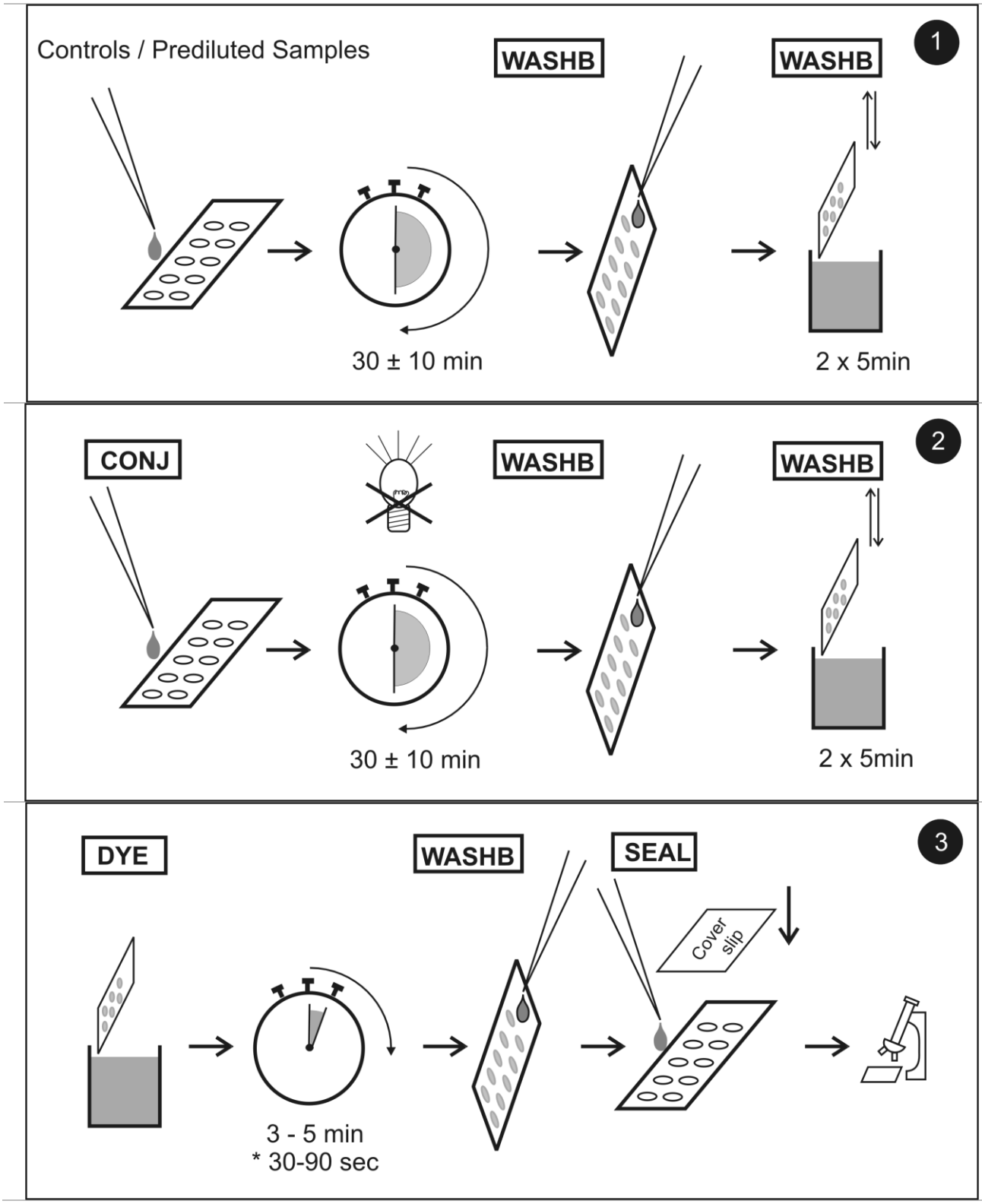
Prima dell'uso, attendere che tutti i componenti abbiano raggiunto la temperatura ambiente (20–26 °C / 68-78,8 °F), mescolare con cura e attenersi allo schema di incubazione raccomandato per una performance ottimale del test.

1. Preparazione del tampone di lavaggio: Diluire 1:10 con acqua distillata il tampone concentrato.
2. Diluizione dei campioni: Diluire i sieri paziente (per il titolo di screening fare riferimento alla sezione ***Principio del test*** più adatta in base al prodotto in uso) con tampone campione 1x. Il titolo varia a seconda del test HEp-2, nDNA, rLKS, EMA ecc.
3. I controlli sono pronti per l'uso.
4. Preparazione di un protocollo: le schede di interpretazione dati sono disponibili nella sezione ***Principio del test*** più adatta in base al prodotto in uso.
5. In caso di aumento della viscosità e/o dell'opacità, riscaldare il reagente del mezzo di montaggio (MMIFA) in bagno termostatico per 15 minuti a 56 °C / 132,8 °F, quindi riportarlo a temperatura ambiente (20–26 °C / 68-78,8 °F) prima dell'uso. Dopo questa procedura, il reagente riscaldato può essere utilizzato per un massimo di 21 giorni consecutivi, a condizione che sia conservato a una temperatura compresa tra 2-8°C / 35,6-46,4 °F, come specificato sull'etichetta del reagente e nelle istruzioni per l'uso.

f. Procedura

N°	Descrizione
1.	Estrarre i vetrini necessari dalla confezione e contrassegnarli. Non toccare i pozzetti. Non las ciar asciugare i vetrini.
2.	**Preparazione del Camera umida:** Dispensare un piccolo volume di acqua distillata o deionizzata in un vassoio di incubazione e inserire i vetrini sui supporti del vassoio stesso. Incubare i vetrini per 30 ± 10 minuti a temperatura ambiente nel vassoio di incubazione umidificato. Utilizzare tempi di incubazione coerenti per il coniugato **Prima incubazione:** Pipettare un volume adeguato di ciascun siero diluito e dei controlli (pronti per l'uso) nei rispettivi pozzetti, evitando il contatto diretto della pipetta con la superficie del vetrino. Verificare che ogni pozzetto sia completamente coperto dal siero corrispondente. È importante utilizzare una quantità di materiale sufficiente per coprire interamente il pozzetto. Evitare, però, che i sieri di pozzetti differenti si mescolino, perché ciò può essere causa di risultati errati.
3.	**Lavaggio:** Dopo l'incubazione rimuovere i vetrini dal vassoio di incubazione e lavare brevemente con tampone di lavaggio utilizzando una bottiglia con spruzzetta. Non spruzzare direttamente sui pozzetti. NOTA: Per evitare contaminazioni inclinare il vetrino lateralmente da una parte e spruzzare la soluzione di lavaggio lungo la linea mediana del vetrino stesso. Ripetere la stessa procedura inclinando il vetrino dalla parte opposta. Lavare il vetrino per 10 minuti con soluzione di lavaggio in un apposito contenitore. Evitare il contatto del substrato con parti solide. Per risultati ottimali cambiare la soluzione di lavaggio una volta dopo 5 minuti. Togliere i vetrini dal contenitore e rimuovere la soluzione di lavaggio in eccesso. NOTA: E' importante che i pozzetti non rimangano mai asciutti durante la procedura di preparazione, altrimenti si danneggerebbe il substrato.
4.	**Seconda incubazione**: Dopo il lavaggio, riporre immediatamente il vetrino portaoggetto nella camera umida e coprire ogni pozzetto con una quantità sufficiente di coniugato FITC pronto per l'uso, in modo tale che il pozzetto risulti interamente coperto. Incubare i vetrini per 30 ± 10 minuti a temperatura ambiente al buio.
5.	**Lavaggio:** Dopo l'incubazione rimuovere i vetrini dal vassoio di incubazione e lavare brevemente con tampone di lavaggio utilizzando una bottiglia con spruzzetta. Non spruzzare direttamente sui pozzetti. Lavare il vetrino per 10 minuti con soluzione di lavaggio in un apposito contenitore. Per risultati ottimali cambiare la soluzione di lavaggio una volta dopo 5 minuti.
6.	**Colorazione di contrasto facoltativa**: Diluire il colorante di contrasto (blu Evans) 1:3000 in tampone di lavaggio e miscelare con cura. Inclinare il colorante di contrasto nella cuvetta e incubarvi i vetrini. Per informazioni dettagliate sui tempi di incubazione, fare riferimento alla sezione ***Principio del test*** più adatta in base al prodotto in uso. Il blu Evans copre la fluorescenza aspecifica di fondo. Trascorso il tempo di incubazione, prelevare il vetrino e lavarlo brevemente con soluzione di lavaggio. Eliminare con cautela l'eccesso di soluzione di lavaggio rimasta sul vetrino. Non tamponare i vetrini su carta assorbente ed evitarne l'essicazione.
7.	**Montaggio**: Aggiungere un volume adeguato di mezzo di montaggio al centro di ciascun vetrino. Coprire con attenzione con il coprioggetto, evitando la formazione di bolle d'aria.
8.	**Microscopia**: Esaminare immediatamente i vetrini con ingrandimento 400 – 800 x al microscopio a fluorescenza (filtro di eccitazione 490 nm, filtro di sbarramento 510 nm).

g. Flusso di lavoro



13. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

ERRORE	CAUSE POSSIBILI	SOLUZIONE
Bassa densità cellulare	• Lisi cellulare dovuta al contatto prolungato con acqua deionizzata. • Tampone spruzzato direttamente sul substrato del pozzetto	Attenersi alla procedura di lavaggio descritta
	Enzimi proteolitici hanno attaccato il substrato	nattivare il siero
Fluorescenza non omogenea	Siero seccato nel pozzetto, fluorescenza più intensa al margine	Incubare sempre in ambiente umido
	Il siero non ha coperto correttamente il pozzetto	Aggiungere una quantità adeguata di materiale
	Reazione crociata tra i pozzetti	Evitare che nella prima incubazione si mescolino i contenuti di più pozzetti
	Pellicola sul vetrino dovuta all'uso di una matita cerata	Utilizzare una matita Controllare l'impostazione del microscopio
	Microscopio impostato non correttamente	Controllare la validità della lampada UV
Aspetto diffuso	Vetrino incubato in frigorifero senza coperchio	Sigillare il vetrino con smalto per unghie o paraffina
	icroscopio IF sporco. Eventualmente graffi sull'obiettivo	Pulire il microscopio attenendosi alle relative istruzioni
Fluorescenza debole o assente	Coniugato e vetrini scongelati e ricongelati	Conservare il coniugato e i vetrini a 2-8 °C / 35,6–46,4 °F.
	Controlli diluiti	Controllare le istruzioni, utilizzare i controlli del kit pronti per l'uso
	• Contaminazione batterica dei sieri o del coniugato • Microscopio non impostato correttamente • pH del tampone di lavaggio troppo basso (pH 7,4 ± 0,2)	Controllare questi aspetti
	Coniugato FITC esposto alla luce	Conservare il coniugato al riparo dalla luce
Fluorescenza di fondo	• Lavaggio non corretto • Vetrino asciugato • Sieri lipemici o emolitici • Errore del microscopio	• Controllare le istruzioni di lavaggio • Non lasciar asciugare i vetrini • Utilizzare solo sieri freschi • Controllare il filtro e l'obiettivo

14. SIMBOLI NORMATIVI

IVD	- Diagnosi in vitro	- For in vitro diagnostic use
	- Pour diagnostic in vitro	- Para uso diagnóstico in vitro
	- In-vitro-Diagnostikum	- In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	- Para uso Diagnóstico in vitro	
REF	- Numero d'ordine	- Cataloge number
	- Référence Catalogue	- Numéro de catálogo
	- Katalognummer	- Αριθμός παραγγελίας
	- Número de catálogo	
LOT	- Descrizione lotto	- Lot
	- Lot	- Lote
	- Chargen Bezeichnung	- Χαρακτηρισμός παρτίδας
	- Lote	
UDI	- Identificatore univoco del dispositivo	- Unique device identifier
	- Identifiant unique de l'appareil	- Identificador único del dispositivo
	- eindeutige Produktidentifizierung	- Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
	- Identificador único do dispositivo	
CE	- Conformità europea	- EC Declaration of Conformity
	- Déclaration CE de Conformité	- Declaración CE de Conformidad
	- Europäische Konformität	- Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- Declaração CE de conformidade	
eIFU WWW.AESKU.COM	- Rispettare le istruzioni elettroniche per l'uso	- See electronical instructions for use
	- Voir les instructions d'utilisation électronique	- Siga las instrucciones electrónicas de uso
	- Elektronsiche Gebrauchsanweisung beachten	- Ακολουθήστε τις ηλεκτρονικές οδηγίες χρήσης
	- Seguir as instruções electrónicas de utilização	
	- Da utilizzarsi entro	- Use by
	- Utilise avant le	- Utilizar antes de
	- Verwendbar bis	- Χρήση μέχρι
	- Utilizar antes de	
+2°C +8°C	- Conservare a 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Store at 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conserver à 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Conservar a 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Lagerung bei 2-8°C (35.6-46.4°F)	- Φυλάσσεται στους 2-8°C (35.6-46.4°F)
	- Conservar entre 2-8°C (35.6-46.4°F)	
	- Prodotto da	- Manufactured by
	- Fabriqué par	- Fabricado por
	- Hergestellt von	- Κατασκευάζεται από
	- Fabricado por	
DYE	- Colorante Blue-Evans	- Evans-Blue Dye
	- coloration au Bleu Evans	- Colorante Azul de Evans
	- Evans-Blue Färbelösung	- Evans Blue
	- Evans Blue	
CONTROL +	- Controllo positivo	- Positive Control
	- Contrôle Positif	- Control Positivo
	- Positiv Kontrolle	- Θετικός ορός ελέγχου
	- Controlo positivo	
CONTROL −	- Controllo negativo	- Negative Control
	- Contrôle Négatif	- Control Negativo
	- Negativ Kontrolle	- Αρνητικός ορός ελέγχου
	- Controlo negativo	
SEAL	- Mezzi di montaggio	- Mounting media
	- milieu de montage	- Medio de montaje
	- Mounting Medium	- Μέσο μονιμοποίησης
	- Meio de montagem	
CONJ	- Coniugato	- Conjugate
	- Conjugé	- Conjugado
	- Konjugat	- Σύζευγμα
	- Conjugado	
	- Vetrino per microscopio	- Microscope slide
	- lame de microscope	- Portaobjetos
	- Objektträger	- Αντικειμενοφόρο πλακίδιο
	- Lâmina	
WASHB 10x	- Tampone di lavaggio	- Wash Buffer
	- Tampon de Lavage	- Solución de lavado
	- Waschpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	- Solucão de lavagem	
SB 1x	- Tampone di campione	- Sample Buffer
	- Tampon de Echantillons	- Solución de muestras
	- Probenpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	- Solução para amostras	

	- Numero di determinazioni	- Number of determnations
	- Nombre de déterminations	- Número de determinaciones
	- Anzahl der Prüfungen	- Αριθμός προσδιορισμών
	- Número de determinações	
	- Non riutilizzare	- Do not reuse
	- Ne pas réutiliser	- No reutilizar
	- Nicht wiederverwenden	- Μην επαναχρησιμοποιείτε
	- Não reutilizar	
	- Proteggere dall'esposizione alla luce	- Protect from exposure to light
	- Protéger de l'exposition à la lumière	- Proteger de la exposición a la luz
	- Vor Sonnenlicht schützen	- Προστασία από την έκθεση στο φως
	- Proteger da exposição à luz	
	- Conservare all'asciutto	- Store dry
	- Stocker au sec	- Almacenar en seco
	- Trocken aufbewahren	- Αποθηκεύστε ξηρά
	- Armazenar em local seco	
	- Non utilizzare se la confezione è danneggiata e consultare le istruzioni per l'uso	- Do not use if package is damaged and consult instructions for use
	- Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé et consulter le mode d'emploi.	- No utilizar si el envase está dañado y consultar las instrucciones de uso
	- Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist, und Gebrauchsanweisung beachten	- Μην χρησιμοποιείτε εάν η συσκευασία έχει υποστεί ζημιά και συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης.
	- Não utilizar se a embalagem estiver danificada e consultar as instruções de utilização	