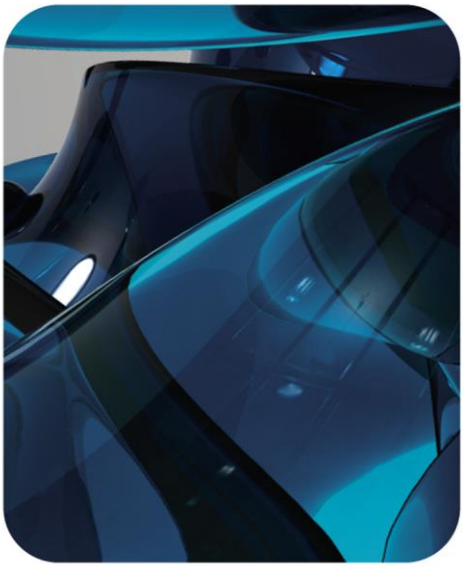
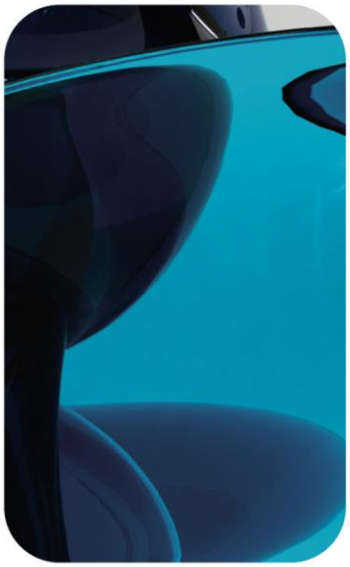
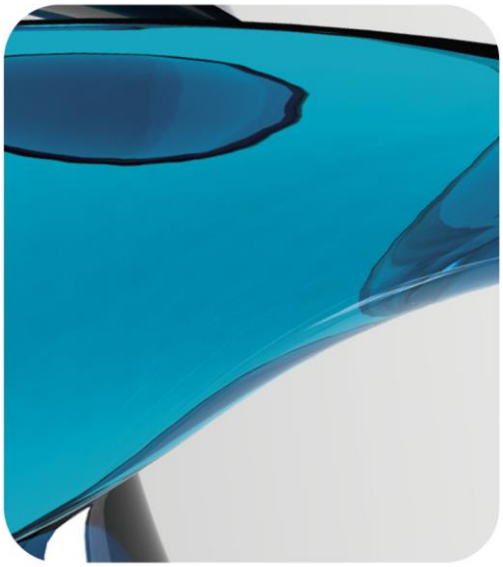
AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

AESKUSLIDES®

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

GREEK

DIN EN ISO 13485

AESKU.DIAGNOSTICS GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim, Germany
Tel: +49-6734-9622-0
Fax: +49-6734-9622-2222
Info@aesku.com
www.aesku.com

AESKUSLIDES®
THE IFA PRODUCT LINE



Οδηγίες χρήσης

ANA-HEp-2

Αναφ.	Περιγραφή	Δοκιμές
51.100.Bulk5	**ANA-HEp-2** (12 βοθρία) μεγάλο κιτ	600
51.101.Bulk5	**ANA-HEp-2** (12 βοθρία) μεγάλο κιτ	600

1. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

AESKUSLIDES ANA-HEp-2 είναι μία δοκιμασία έμμεσου ανοσοφθορισμού για τον προσδιορισμό πυρηνικών και/ ή κυτοπλασματικών αυτοαντισωμάτων στον ανθρώπινο ορό.

Η δοκιμασία εξυπηρετεί στη διαφοροδιάγνωση συστηματικών ρευματικών παθήσεων όπως τον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ), μικτές κολλαγονώσεις (mixed connective tissue diseases, MCTD), σκληροδερμία, σύνδρομο Sjögren, πολυμυοσίτιδα και δερματομυοσίτιδα.

2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ

Τα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA) τάσσονται ενάντια σε ένα μεγάλο αριθμό πυρηνικών και κυτοπλασματικών αντιγόνων και εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα σε συστηματικές ρευματικές παθήσεις. Οπότε η διαπίστωσή τους είναι ένα σημαντικό βοηθητικό μέσο για τη διαφοροδιάγνωση αυτών των νοσημάτων. Έτσι, π.χ. σχετίζονται τα αντισώματα SS-A (Ro)- και SS-B (La) με το ΣΕΛ και το σύνδρομο Sjögren (SS) τα αντι-dsDNA αντισώματα και αντι -Sm αντισώματα, αντισώματα ενάντια σε ιστόνες και αντισώματα ενάντια σε πυρηνοσώματα με το ΣΕΛ (συστηματικός ερυθηματώδης λύκος). Τα αντι-RNP-αντισώματα σχετίζονται με μικτές κολλαγονώσεις και ΣΕΛ, αντι-Scl-70 αντισώματα με σκληροδερμία (προοδευτική συστηματική σκλήρυνση PSS), αντι-Jo-1 αντισώματα με πολυμυοσίτιδα και δερματομυοσίτιδα και αντισώματα ενάντια σε κεντρομεριδικές πρωτεΐνες με το σύνδρομο CREST. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην Ενότητα 4 παρακάτω.

Για την ανίχνευση των ANA ήταν η δοκιμασία έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFT) σε ευκαρυωτικά κύτταρα όπως κύτταρα HeLa και Hep2 μέχρι τώρα η μέθοδος εκλογής. Ο IFT είναι μεν μία ευαίσθητη μέθοδος, όμως η δοκιμασία μεγάλου αριθμού ορών είναι πολύ επίπονη. Ακόμη, είναι δυνατόν το σύστημα δοκιμασίας να περιέχει κάποια σφάλματα λόγω της ερμηνείας των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας από το προσωπικό του εργαστηρίου και των διαφορών των μικροσκοπίων φθορισμού. Η ειδικότητα των μεμονωμένων ANA μπορεί να προσδιοριστεί μέσω δοκιμασίας με ειδικά ELISA, τα οποία χρησιμοποιούν ειδικά αντιγόνα. Αυτό επιτρέπει μία απλή και αξιόπιστη διαφοροποίηση των ANA σύμφωνα με την ειδικότητά τους.

Χαρακτηρισμός αντιγόνων: κύτταρα HEp-2

Αντιδράσεις διασταύρωσης: Δεν έχουν γίνει γνωστές

Η δοκιμασία βασίζεται στην αρχή του προσδιορισμού έμμεσου ανοσοφθορισμού:. Οι γυάλινες αντικειμενοφόροι μικροσκοπίου επικαλύπτονται με τομές ιστών ή κύτταρα (κύτταρα HEp-2 για τον προσδιοριαμό ANA, κοκκιοκύτταρα για τον προσδιορισμό ANCA ή Crithidia luciliae για τον πορσδιορισμό άντι nDNA αντισωμάτων). Αν ο ορός του ασθενούς περιέχει αντισώματα ενάντια σε συστατικά συτοιχεία των ιστών ή κυττάρων αυτά συνδέονται κατά τη διάρκεια της πρώτης επώασης στο αντίστοιχο υπόστρωμα επάνω στο αντικειμενοφόρο. Το μη δεσμευμένο υλικό απομακρύνεται με ένα βήμα πλύσης. Τα συνδεμένα αντισώματα του ασθενή ανιχνεύονται με αντιανθρώπινες ανοσοσφαιρίνες σημασμένες με φλουορεσκεΐνη κατά τη διάρκεια της δεύτερης

επώασης, τα οποία συνδέοενται στα συνδεμένα αντισώματα του ασθενή και απεικονίζονται με την χρωστική τους ουσία φθορισμού. Προκύπτει μια ειδική πράσινη φθορίζουσα χρώση συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος, η οποία μπορεί να απεικονιστεί με τη βοήθεια ενός μικροσκοπίου φθορισμού.

3. ΑΡΧΕΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Ανατρέξτε στη Διεξαγωγή δοκιμασίας στην Ενότητα 12, του Κοινού εγχειριδίου, για λεπτομερείς οδηγίες. Τα παρακάτω στοιχεία θα χρησιμοποιηθούν για τα κιτ ANA HEp-2:

- Χρόνος αντίχρωσης: 30 έως 90 δευτερόλεπτα
- Συνιστώμενος τίτλος ελέγχου:
  - 1:80 για δείγματα ενηλίκων
  - 1:40 για παιδιατρικά δείγματα.

4. ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Τα κύτταρα HEp2 είναι ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία καλλιεργήθηκαν από έναν ιστό λαρυγγικού καρκινώματος ενός ασθενή. Το υπόστρωμα παρέχει μία ομοιογενής κυτταρική ανάπτυξη χωρίς κυτταρικές συνδέσεις. Για την αξιολόγηση δειγμάτων είναι σημαντική η ύπαρξη κυττάρων στο στάδιο της μίτωσης, διότι έτσι καθορίζονται με μεγαλύτερη ακρίβεια οι πυρηνικές σχηματομορφές.

Ο αντίστοιχος τελικός τίτλος είναι αυτή η αραίωση ενός ορού ασθενούς, κατά την οποία ο ορός εμφανίζει ακόμη θετικό φθορισμό.

Η αξιολόγηση θα πρέπει να διεξάγεται συνεχώς με θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες. Ελαφρός φθορισμός σε τίτλους μεταξύ 1:40 (παιδιά) και 1:80 (ενήλικες) ή ασάφεια σε σχέση με τα κλινικά αποτελέσματα θα πρέπει να ελέγχεται με ελέγχους παρακολούθησης.

Σε τέτοιες περιπτώσεις θα πρέπει να συλλέγονται τα δείγματα ασθενών περίπου κάθε 6 εβδομάδες και να δοκιμάζονται μέσω μίας αντίστοιχης όμοιας διαδικασίας. [1]

4.1 Σχηματομορφή της μεμβράνης του κυτταρικού πυρήνα

4.1.1 Ελαφρά χρώση της μεμβράνης του πυρήνα

Ελαφρός ομοιογενής δακτυλιόμορφος φθορισμός της μεμβράνης του κυτταρικού πυρήνα σε κύτταρα ενδιάμεσης φάσης. Μερικά δείγματα με ισχυρά αντισώματα δίνουν την εντύπωση χρώσης ολόκληρου του κυτταρικού πυρήνα. Μία όμοια σχηματομορφή παρατηρείται σε κύτταρα της τελόφασης. Σε κύτταρα της μετάφασης ωστόσο εμφανίζεται αυτός ο φθορισμός διάχυτος στο κυτόπλασμα και το χρωμοσωμιακό υλικό παραμένει χωρίς χρώση.

4.1.2 Διακεκομμένες σχηματομορφές μεμβράνης κυτταρικού πυρήνα

Ένας ασυνεχής διακοπτόμενος φθορισμός κατά μήκος της μεμβράνης του κυτταρικού πυρήνα. Κατά την εστίαση μέσα από τον κυτταρικό πυρήνα είναι δυνατό να παρατηρηθεί η διακοπτόμενη χρώση στην επιφάνεια του πλήρους κυτταρικού πυρήνα.

Μία όμοια σχηματομορφή εμφανίζεται στην τελόφαση. Σε κύτταρα μετάφασης ο φθορισμός είναι κατανεμημένος διάχυτος στο κυτόπλασμα. Μερικά δείγματα με ισχυρά αντισώματα δίνουν την εντύπωση χρώσης ολόκληρου του κυτταρικού πυρήνα.

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

4.2 Σχηματομορφή του κυτταρικού πυρηνοπλάσματος (πυρηνοπλασματικές σχηματομορφές)

4.2.1 Ομοιογενής σχηματομορφή κυτταρικού πυρήνα

Ένας ομοιόμορφος διάχυτος φθορισμός σε όλο το πυρηνόπλασμα, ο οποίος μερικές φορές είναι δυνατό να προβάλλεται στην περιφέρεια του κυτταρικού πυρήνα, είναι δυνατό να συσχετιστεί με διάφορα αντισώματα, τα οποία τάσσονται συνήθως ενάντια σε συστατικά στοιχεία των χρωμοσωμάτων (DNA, ιστόνες κλπ.). Σε μερικές περιπτώσεις εμφανίζεται ισχυρότερη χρώση της εσωτερικής περιοχής του κυτταρικού πυρήνα (πυρηνική παρυφή).
Μερικά δείγματα είναι δυνατό να εμφανίσουν πρόσθετα μία περιφερική χρώση των πυρηνίσκων. Η χρώση των πυρηνίσκων είναι μεταβλητή. Στη μετάφαση παρατηρείται μία ομοιογενής χρώση ή μία χρώση της χρωματίνης.

Διαφοροποιούνται οι εξής ελαφρώς διαφορετικές σχηματομορφές:
- *Ομοιογενής πυρηνική με ομοιογενής χρώση των πυρηνίσκων*
- *Ομοιογενής πυρηνική χωρίς χρώση των πυρηνίσκων*

4.2.2 Διάστικτη χρώση του κυτταρικού πυρήνα

Εμφανίζονται μία σειρά διάστικτων σχηματομορφών του κυτταρικού πυρήνα, οι οποίες είναι δύσκολο να διαφοροποιηθούν. Με την κατάλληλη επιμέλεια διαφοροποιούνται επτά σχηματομορφές. Τα μεταφασικά χρωμοσώματα παρμένουν σε έξι από αυτές τις σχηματομορφές αρνητικά και εμφανίζουν μία θετική χρώση στη λεγόμενη κεντομεριδική σχηματομορφή.

4.2.3 Ευμεγέθης διάστικτη πυρηνική σχηματομορφή (πυρηνική μήτρα) (SC35)

Διαφορετικού μεγέθους διαστίξεις κατανεμημένες στο πυρηνόπλασμα, παλαιότερα οριζόταν ως χρώση της πυρηνικής μήτρας. Προκύπτει πιθανώς λόγω χρώσης των κοκκίων ενδιάμεσης χρωματίνης. Οι πυρηνίσκοι παραμένουν αρνητικοί. Το μεταφασικό και τελοφασικό κυτόπλασμα εμφανίζει μία διάχυτη παρατεταγμένη διάστιξη με αρνητική χρωματίνη.

4.2.4 Χονδροειδής διάστικτη πυρηνική σχηματομορφή

Πυκνά κατανεμημένη διάστιξη διαφόρων μεγεθών, συνήθως προκύπτουν ευμεγέθεις διαστίξεις, οι οποίες κατανέμονται στο πυρηνόπλασμα στα κύτταρα ενδιάμεσης φάσης. Οι πυρηνίσκοι παραμένουν αρνητικοί. Το κυτόπλασμα κυττάρων της μετάφασης και τελόφασης εμφανίζει μία διάστιξη, η οποία πυκνώνει γύρω από τη χρωματίνη, η χρωματίνη η ίδια παραμένει αρνητική.

Αυτή η σχηματομορφή σχετίζεται συνήθως με μία χρώση των splicesome.

4.2.5 Λεπτοειδής διάστιξη του κυτταρικού πυρήνα

Μία λεπτοειδής διάστικτη χρώση σε ομοιόμορφη κατανομή, μερικώς πολύ πυκνή, έτσι ώστε η σχηματομορφή να δείχνει σχεδόν ομοιογενής. Οι πυρηνίσκοι μπορεί να είναι θετικοί (ιδιαίτερα με αντισώματα αντι-SS-B/La), ή μπορεί και να παραμείνουν αρνητικοί. Το κυτόπλασμα κυττάρων της μετάφασης εμφανίζει μία λεπτοειδής διάστιξη, η οποία πυκνώνει γύρω από τη χρωματίνη, η χρωματίνη η ίδια παραμένει αρνητική.

Οι πυρηνίσκοι κυττάρων στην τελόφαση μπορεί να είναι θετικοί, εδώ εμφανίζουν μερικές φορές εντονότερη χρώση απ’ ότι σε κύτταρα στην ενδιάμεση φάση.

4.2.6 Κοκκιώδης, όμοια με Scl 70 σχηματομορφή

Μία ομοιόμορφη κοκκιώδης διάστιξη του πυρηνοπλάσματος και των χρωμοσωμιακών περιοχών σε κύτταρα της μετάφασης και τελόφασης, συχνά με έντονους θετικούς πυρηνίσκους. Η χρώση είναι δυνατό να εμφανίζεται ομοιογενής σε ελάχιστες μεγεθύνσεις. Αυτή η σχηματομορφή δεν παρατηρείται μόνο σε αντι-Scl 70 θετικούς ορούς.

4.2.7 Πολύμορφη διάστιξη κυτταρικών πυρήνων

Οι πυρήνες κυττάρων που βρίσκονται σε πολλαπλασιασμό (φάση S) εμφανίζουν μεγάλο αριθμό διαφόρων διαστίξεων του πυρηνοπλάσματος, από λεπτοειδής έως πολύ χονδροειδής, ανομοιόμορφη διάστιξη (ανάλογα με την κυτταρική παρασκευή μπορεί αυτό να αφορά το 10-50% των κυττάρων): σε μερικά κύτταρα χρωματίζονται και οι πυρηνίσκοι. Κύτταρα στη φάση ανάπαυσης (φάση G) καις στη μετάφαση παραμένουν αρνητικά. Αυτή η σχηματομορφή

χαρακτηρίζεται και ως αντι-PCNA σχηματομορφή (anti-proliferating cell nuclear antigen) και εμφανίζεται συνήθως σε συνδυασμό με άλλες σχηματομορφές.

4.2.8 Δεντρομεριδική σχηματομορφή

Αρκετά ομοιόμορφα μεμονωμένα στίγματα, τα οποία κατανέμονται σε ολόκληρο τον κυτταρικό πυρήνα διάστιξη (40-60 στίγματα ανά κυτταρικό πυρήνα). Κύτταρα στην τελόφαση και μετάφαση εμφανίζουν αυτά τα στίγματα πάντα σε συγκεντρωμένο χρωμοσωμικό υλικό. Αυτή η σχηματομορφή προκαλείται από αντισώματα ενάντια στους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων. Τα αντισώματα μπορούν να τάσσονται ενάντια σε διάφορες αρκετές πρωτεΐνες (CENP-A, B, C, D, E).

4.2.9 Πολλαπλά πυρηνικά στίγματα (NSp-1)

5-10 στίγματα (Dots) ανά κυτταρικό πυρήνα. Εδώ χρωματίζονται πυρηνικοί υποσχηματισμοί, οι οποίοι συχνά χαρακτηρίζονται ως σωματίδια PML (λόγω της έντονης παρουσίας τους σε προμυελοκυτταρική λευχαιμία). Χρωμοσώματα της μετάφασης και της τελόφασης παραμένουν αρνητικά.

4.2.10 Μερικά πυρηνικά στίγματα (Dots)

2-6 στίγματα ανά κυτταρικό πυρήνα, τα οποία εντοπίζονται στο πυρηνόπλασμα. Βρίσκονται συχνά σε στενή γειτνίαση με τους πυρηνίσκους. Καμία χρώση της μεταφασικής και τελοφασικής χρωματίνης.

4.3 Σχηματομορφές πυρηνίσκων

4.3.1 Ομοιογενής σχηματομορφή πυρηνίσκων

Φθορισμός ολόκληρου του πυρηνίσκου χωρίς χρώση των χρωμοσωμάτων ή της πυρηνισκικά οργανωμένης περιοχής (NOR) σε κύτταρα που βρίσκονται στον πολλαπλασιασμό.

4.3.2 Σβωλοειδής σχηματομορφή πυρηνίσκων

Ανοιχτόχρωμα συσσωματωμένα ευμεγέθεις κοκκία, τα οποία ανήκουν στον εξοπλισμό των ινωδών κεντρών των πυρηνίσκων. Σε μιτωτικά κύτταρα φαίνεται η μεταφασική και τελοφασική πλάκα να έχει έναν ανομοιόμορφο θηκοειδή φθορισμό.

4.3.3 Διακεκομμένη σχηματομορφή πυρηνίσκων

Μικροί μεμονωμένοι κόκκοι, οι οποίοι ανευρίσκονται κυρίως στα κέντρα των πυρηνίσκων. Σε μεταφασικά κύτταρα μπορούν να βρεθούν 2-5 διακριτικά στίγματα εντός του σώματος της σρωματίνης, το οποίο ανήκει στην πυρηνισκικά οργανωμένη περιοχή.

4.4 Σχηματομορφή της χρωμοσωμικής ατράκτου

4.4.1 Σχηματομορφή κεντρομεριδίων (κεντρόσωμα)

Στη μετάφαση ατρακτοποιούνται διακριτικά σημεία φθορισμού σε κάθε πόλο της ατράκτου, τα οποία βρίσκονται κάθετα μεταξύ τους.

Στα κύτταρα ενδιάμεσης φάσης εμφανίζονται ένα ή δύο ανοιχτόχρωμα σημεία στο κυτόπλασμα, αυτά βρίσκονται κοντά στον κυτταρικό πυρήνα.

4.4.2 Σχηματομορφή των πόλων της ατράκτου (NuMA)

Περιοχές φθορισμού των πόλων της ατράκτου σε μεταφασικά κύτταρα (τριγωνική ή μπανανόμορφη σχηματομορφή). Οι ίνες της ατράκτου είναι αρνητικές με μία περισσότερο γραμμική σχηματομορφή σε τελοφασικά κύτταρα. Μία λεπτοειδής διάστιξη με αρνητικούς πυρηνίσκους παρατηρείται συνήθως σε τελοφασικά κύτταρα, αυτά μπορούν όμως να είναι και αρνητικά.

4.4.3 Σχηματομορφή των ινών της ατράκτου

Μία χρώση ολόκληρης της χρωμοσωμικής ατράκτου από τον πόλο προς τους χρωμοσωμικούς δίσκους σε μεταφασικά κύτταρα. Καμία χρώση των χρωμοσωμάτων σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται.

4.4.4 Σχηματομορφή Midbody (MSA-2)

Σε προφασικά και μεταφασικά κύτταρα εμφανίζεται ο φθορισμός ως λεπτές ταινίες στη χρωμοσωμική περιοχή, οι οποίες βρίσκονται κάθετες ως προς την πλευρά της μεταφσικής πλάκας. Στην τελόφαση ο φθορισμός περιορίζεται στην αύλακα της διαίρεσης και σε ένα στενό συνδετικό μέσω σωματίδιο (Midbody) μεταξύ των κυττάρων, τα οποία ολοκληρώνουν την κυτταρική διαίρεση. Κύτταρα στις φάσεις S και G2 εμφανίζουν διακριτικά ή ανομοιόμορφα στίγματα. Η σχηματομορφή προκαλείται από αντισώματα ενάντια στο αντιγόνο MSA-2 (Mitotic Spindle Antigen 2).

4.4.5 Σχηματομορφή C-F

Η χαρακτηριστική ιδιότητα ανευρίσκεται σε μεταφασικά κύτταρα, στα οποία η σχηματομορφή αποτελείται από δύο ομάδες πυκνών μεγάλων κόκκων, τα οποία περιβάλλουν τη χρωμοσωμική μεταφασική πλάκα σα μία χειρολαβή, αυτό συχνά ομοιάζει με φερμουάρ. Αυτοί οι κόκκοι είναι τμήμα των κεντρομεριδίων. Το περιβάλλον κυτόπλασμα χρωματίζεται διάχυτα. Σε κύτταρα στην πρόφαση εμφανίζεται μία πυκνή διακεκομμένη συσσωμάτωση στα χρωμοσώματα. Είναι πιθανό να γίνει ορατή μία πολύ λεπτοειδής πυρηνική διάστιξη σε κάποια κύτταρα της ενδιάμεσης φάσης. Η σχηματομορφή προκαλείται από αντισώματα ενάντια στο αντιγόνο MSA-3 Antigen (Mitotic Spindle Antigen 3), το οποίο μπορεί να είναι πανομοιότυπο με την κεντρομεριδική πρωτεΐνη F (CENP-F).

4.5 Κυτοπλασματικές σχηματομορφές

4.5.1 Λεπτοειδής διάστιξη του κυτοπλάσματος

Λεπτοί κόκκοι κατανεμημένοι σε ολόκληρο το κυτόπλασμα. Εμφανίζονται συχνά διαυγέστεροι στην περιφέρεια του κυττάρου και παράγουν εδώ μία εικόνα όμοια με νέφος αστεριών. Καμία χρώση των κυτταρικών πυρήνων ή πυρηνίσκων. Αυτή η σχηματομορφή είναι χαρακτηριστική για αντισώματα τα οποία τάσσονται ενάντια στις tRNA συνθετάσες. Τα χρωμοσώματα στη μετάφαση είναι αρνητικά.

4.5.2 Διάχυτη κυτοπλασματική σχηματομορφή

Ένας πολύ λεπτός, πυκός, κοκκιώδης ή ομοιογενής φθορισμός ή μία όμοια με νέφος σχηματομορφή, ο οποίος καταλαμβάνει τμήματα του κυτοπλάσματος. Καμία χρώση των κυτταρικών πυρήνων, οι πυρηνίσκοι μπορεί ωστόσο να χρωματίζονται ομοιόμορφα, όταν τάσσονται αντισώματα ενάντια σε ριβοσωμικές πρωτεΐνες RNA, των οποίων οι πρόδρομες μορφές βρίσκονται στους πυρηνίσκους. Το χρωμοσωμικό υλικό σε μεταφασικά κύτταρα είναι αρνητικό.

4.5.3 Μιτοχονδρικές σχηματομορφές

Ευμεγέθεις ανομοιόμορφοι κόκκοι, οι οποίοι φτάνουν με μορφή ενός δικτυωτού κυκλώματος από τον κυτταρικό πυρήνα στο κυτόπλασμα. Η συσσωμάτωση αντιγόνων M2, η οποία εμφανίζεται κυρίως αποτελείται από 4 μιτοχονδρικές πρωτεΐνες της εσωτερικής μιτοχονδρικής μεμβράνης. Κυτταρικοί πυρήνες και πυρηνίσκοι είναι αρνητικοί, ωστόσο οροί με υψηλού τίτλους αντισωμάτων είναι δυνατό να προκαλέσουν την εντύπωση μίας διάστιξης του κυτταρικού πυρήνα.

4.5.4 Λυσοσωμιακές σχηματομορφές

Ανομοιόμορφος φθορισμός μεταξύ των μεγάλων οργανίδιων, κατανεμημένος στο κυτόπλασμα. Αυτός μπορεί να προκληθεί από αντισώματα ενάντια σε μικρά οργανίδια όπως λυσοσώματα ή υπεροξυσώματα. Ο κυτταρικός πυρήνας δε χρωματίζεται, όμως διάχυτη χρώση του κυτοπλάσματος από διαιρούμενα κύτταρα.

4.5.5 Σχηματομορφή Golgi

Χρωματισμός πολικών οργανιδίων κοντά στον κυτταρικό πυρήνα, κοκκία με ανομοιόμορφα μεγέθη. Ο κυτταρικός πυρήνας και οι πυρηνίσκοι είναι αρνητικοί. Διάχυτη χρώση του κυτοπλάσματος διαιρούμενων κυττάρων, η οποία είναι εντονότερη στην περιοχή του χρωμοσωμικού υλικού.

4.5.6 Σχηματομορφή ακτίνης

Χρώση των ινών κυτταρικής τάσης, οι οποίες βρίσκονται σε ένα απλό εστιακό επίπεδο κάτω από την πλασματική μεμβράνη. Κυτταρικοί πυρήνες, πυρηνίσκοι και μεταφασικά χρωμοσώματα είναι αρνητικά. Τα νήματα ακτίνης κοντά στην πλασματική μεμβράνη εκτείνονται σε ολόκληρο το κυτταρικό μήκος. Μπορεί επίσης να παρατηρηθεί δενδριτική επέκταση στην κυτταρική μεμβράνη.

4.5.7 Σχηματομορφή βιμεντίνης

Λεπτές ίνες σε αρκετή ποσότητα επεκτείνονται σε ολόκληρο το κυτόπλασμα και παράγουν στη χρώση ένα ακτινωτό πλέγμα. Επίσης είναι δυνατό να χρωματιστούν συσσωματωμένες δεσμίδες ινών γύρω από των κυτταρικό πυρήνα, αυτές εμφανίζονται σπειροειδείς. Κυτταρικοί πυρήνες και πυρηνίσκοι είναι αρνητικοί.

4.6 Αρνητικό

4.6.1 Παράδειγμα 1

Το κυτόπλασμα οι κυτταρικοί πυρήνες δεν εμφανίζουν σχεδόν καθόλου πράσινο φθορισμό. Μεμονωμένες, συχνά ανομοιόμορφες πράσινες κηλίδες, οι οποίες παρατηρούνται στο οπτικό πεδίο, είναι δυνατό να παρουσιάσουν συσσωματώματα της σύζευξης. Οι κυτταρικές δομές μπορεί να εμφανιστούν προς το καφέ χρώμα (π.χ. πυρηνίσκοι), ιδιαίτερα σε παλιά παρασκευάσματα ή σε παρασκευάσματα τα οποία φυλάχτηκαν με αντι- ξεθωριαστικά αντιδραστήρια. Κυτταρικά θραύσματα είναι δυνατό να προκαλέσουν επίσης φθορίζουσες πράσινες παρεμβολές.

4.6.2 Παράδειγμα 2

Εμφανίζεται ένας πολύ θαμπός πρασινωπός φθορισμός των κυτταρικών πυρήνων και/ ή του κυτοπλάσματος, των οποίων η ένταση βρίσκεται υπό ελαφρώς θετικό δείγμα. Η αξιολόγηση αυτού του δείγματος επιτυγχάνεται καλύτερα διεξάγοντας παράλληλα με την καθημερινή διενέργεια της δοκιμασίας πάντοτε ένα ασθενώς θετικό δείγμα ANA, ένα αρνητικό δείγμα ANA και ένα θετικό δείγμα ANA ως μάρτυρες.

4.7 Απροσδιόριστο

Οποιαδήποτε άλλη σχηματομορφή, η οποία σχετίζεται με υποκυτταρικά οργανίδια ή δομές, οι οποίες δεν έχουν ακόμη συμπεριληφθεί στην ταξινόμηση.

4.8 Παράρτημα

Εργαστήρια, τα οποία χρησιμοποιούν για τη διάγνωση των ANA κρυοστατικές ιστικές τομές π.χ. ήπαρ ή νεφρό από τρωκτικά, δεν μπορούν να αποδώσουν τις εξής σχηματομορφές φθορισμού: πολύμορφοι διάστικτοι κυτταρικοί πυρήνες,

Κεντρομεριδική σχηματομορφή, πολλαπλά πυρηνικά στίγματα, μερικά πυρηνικά στίγματα (coiled body pattern), μερικές σχηματομορφές πυρηνίσκων και τις περισσότερες κυτοπλασματικές σχηματομορφές. Δεν αναγνωρίζονται επίσης σχηματομορφές της χρωμοσωμικής ατράκτου. Οι μιτοχονδρικές σχηματομορφές είναι δυνατό να αναγνωριστούν στους περισσότερους ιστούς ως χονδροειδείς διάστικτες σχηματομορφές, οι οποίες ανιχνευόταν παλαιότερα σε ζωικές ιστικές τομές νεφρών. Ο ασθενής φθορισμός της κυτταρικής μεμβράνης εμφανίζεται συχνά έντονα σε τομές ήπατος αρουραίου. Οι οριακοί τίτλοι για θετικά ANA σε κύτταρα HEp-2 βρίσκονται συνήθως πάνω από 1:100, κατά τη χρήση ιστικών τομών βρίσκεται συνήθως παρακάτω.

Συχνά εμφανίζει ένας ορός περισσότερες διαφορετικές σχηματομορφές, π.χ. πολλαπλά πυρηνικά στίγματα μαζί με μιτοχονδρική σχηματομορφή (και οι δύο είναι χαρακτηριστικές για την πρωτοπαθή χολική κίρρωση) και την πολύμορφη διάστικτη πυρηνική σχηματομορφή μαζί με ομοιογενή χρώση κυτταρικών πυρήνων, χονδροειδής ή λεπτοειδής διάστιξη (οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για το συστηματικό ερυθηματώδη λύκο). Επίσης εμφανίζεται η κεντρομεριδική σχηματομορφή συχνά μαζί με τη μιτοχονδρική σχηματομορφή.

Θα πρέπει να γίνει υπόδειξη ότι κάποια εργαστήρια και δοκιμασίες χρησιμοποιούν συζεύξεις FITC, οι οποίες τάσσονται ενάντια σε όλες τις ομάδες ανοσοσφαιρινών, το παρόν γλωσσάριο βασίζεται στα αποτελέσματα για συζεύξεις ειδικές για IgG.

5. ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Εκατόν τριάντα οχτώ ψυγμένα δείγματα ελέγχθηκαν σε δύο παρτίδες αντιδραστηρίων από άλλη εταιρεία και σε δύο παρτίδες AESKUSLIDES. Τα 118 κλινικά δείγματα είχαν φυλαχθεί για αρκετά έτη και αντιπροσώπευαν ασθενείς που είχαν αξιολογηθεί για ρευματικές παθήσεις. Στον έλεγχο συμπεριλήφθηκαν και είκοσι δείγματα από προγράμματα υγείας. Τα δείγματα από προγράμματα υγείας αντιπροσώπευαν έναν πληθυσμό χωρίς γνωστά κλινικά συμπτώματα ρευματικών παθήσεων. Η σύγκριση των δύο κιτ είχε ως στόχο να καταδείξει τη συγκρισιμότητα μεταξύ των συστημάτων ANA HEp-2 δύο ανεξάρτητων κατασκευαστών, καθώς και τη συνέπεια των σχηματομορφών.

a. Πίνακας 1: Συνδυασμένα δεδομένα ορίων αξιοπιστίας

		Ανάλυση επιβεβαίωσης		
		Θετικά	Αρνητικά	Σύνολο
AESKUSLIDES ANA HEp-2	Θετικά	116	0	116
	Αρνητικά	0	22	22
	Σύνολο	116	22	138

Ποσοστό (%) συμφωνίας θετικών αποτελεσμάτων = 116/116 = 100% (95% CI (όρια αξιοπιστίας): 96.8 - 100%)
Ποσοστό (%) συμφωνίας αρνητικών αποτελεσμάτων = 22/22 = 100% (95% CI (όρια αξιοπιστίας): 85.1 - 100%)

b. Πίνακας 2: Σύγκριση σχηματομορφών συνδυασμένων δεδομένων μεταξύ της ανάλυσης επιβεβαίωσης και του Aesku

Σχηματομορφή	n	Ανάλυση επιβεβαίωσης	AESKUSLIDES
Ομοιογενής	32	32	32
Διάστικτη	82	82	82
Πυρηνιακή	20	20	20
Κεντρομεριδική	6	6	6
Περιφερική	3	3	3
Πυρηνική μεμβράνη	1	1	1

N =144[2]

Τα κλινικά δείγματα αντιπροσώπευαν ένα πλήρες φάσμα αυτοάνοσων νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένου του ΣΕΛ, της σκληροδερμίας, της σκληροδερμίας-CREST, του συνδρόμου Sjogren, της μεικτής νόσου του συνδετικού ιστού (MCTD), του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της πολυμυοσίτιδας/δερματομυοσίτιδας, του φαρμακοπροκληθέντος ΣΕΛ κλπ.

5.1 Αναπαραγωγιμότητα και ακρίβεια

Τρεις διαφορετικές ΠΑΡΤΙΔΕΣ AESKUSLIDES ελέγχθηκαν με 15 δείγματα ορού, τα οποία καλύπτουν το πλήρες σύνολο των σχηματομορφών. Αυτά τα δείγματα αραιώθηκαν σε αναλογία από 1:40 έως και 1:10240 και κάθε διάλυμα αναλύθηκε από δύο ανεξάρτητες συσκευές ανάγνωσης και στις τρεις ΠΑΡΤΙΔΕΣ. Τα κριτήρια αποδοχής ήταν απόκλιση +/- 1 από την ένταση φθορισμού. Τα κριτήρια αποδοχής καλύφθηκαν για όλα τα δείγματα, όλα τα διαλύματα, όλες τις ΠΑΡΤΙΔΕΣ και όλες τις ανεξάρτητες συσκευές ανάγνωσης.

Αναλυτικότερες πληροφορίες διατίθενται κατόπιν αίτησης.

[2] Η ασυμφωνία μεταξύ του αριθμού N=138 από τον Πίνακα 1 και του αριθμού N=144 από τον Πίνακα 2 οφείλεται στο γεγονός ότι ορισμένα δείγματα δεν είχαν καμία σχηματομορφή (π.χ. δείγμα αρ. 5), ενώ κάποια άλλα δείγματα είχαν δύο σχηματομορφές (π.χ. δείγμα αρ. 2). Ο Πίνακας 2 αναφέρεται μόνο στον αριθμό των σχηματομορφών.

6. ΦΥΛΛΟ ΕΡΜΗΝΕΙΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

ANA-HEp2

Ημερομηνία:	Παρτίδα:
Αρ. αντικειμενοφόρου:	Χειριστής:

Αρ. βοθρίου	Αναγνωριστικό	Παράγοντας αραίωσης	F.I.	Χρωμοσώματα (μίτωση)	Πυρηνόπλασμα	Πυρηνίσκος	Κυτόπλασμα	Αυτοαντισώματα	Παρατηρήσεις
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									

7. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΤΥΠΙΚΟΥ ΚΙΤ

7.1 ΤΥΠΙΚΑ ΚΙΤ

		ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΟΙ (50x σε κάθε κιτ)			ΣΥΖΕΥΓΜΑ (3x 7,5 ml)		ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ (1x 0,5 ml)	
Αναφ. κιτ	**Περιγραφή του κιτ**	**Αναφ.**	**Βοθρία**	**Επικαλλυμένα με**	**Αναφ.**	**Περιγραφή**	**Αναφ.**	**Περιγραφή**
51.100.Bulk5	ANA HEp-2 (12 βοθρία)	s51.100	12	ANA Hep-2 Κύτταρα	C51.100.Bulk	**IgG** Μπλε καπάκι: διάλυμα ελαφρώς μπλε χρώματος. Συστατικά στοιχεία: BSA, Φλουορεσκεΐνη (FITC)-επισημασμένο αντι-ανθρώπινο αντίσωμα	PC51.100	Μάρτυρας σχηματομορφής ANA (Ομοιογενής) Κόκκινο καπάκι: άχρωμο διάλυμα. Συστατικά στοιχεία: Ανθρώπινος ορός (διαλυμένος), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό)
51.101.Bulk5	ANA HEp-2 (12 βοθρία)				C51.101.Bulk	**IgG** Μπλε καπάκι: διάλυμα ελαφρώς μπλε χρώματος. Συστατικά στοιχεία: BSA, Φλουορεσκεΐνη (FITC)-επισημασμένο αντι-ανθρώπινο αντίσωμα ,(H+L)	PC51.101	Μάρτυρας σχηματομορφής ANA (Ομοιογενής) Κόκκινο καπάκι: άχρωμο διάλυμα. Συστατικά στοιχεία: Ανθρώπινος ορός (διαλυμένος), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό), (H+L)

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τα περιεχόμενα των υπόλοιπων συστατικών των κιτ, δηλαδή, τα κοινά αντιδραστήρια (αρνητικός ορός ελέγχου, μέσο μονιμοποίησης κλπ.) περιγράφονται παρακάτω στην ενότητα 8 ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΚΟΙΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

8. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΚΟΙΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

a. Κοινά αντιδραστήρια

Ποσότητα	Αναφ.	αντιδραστήριο	Όγκος	Περιγραφή	Έτοιμο προς χρήση
1x	**NCIFA**	Αρνητικός μάρτυρας	0.5ml	Πράσινο καπάκι: άχρωμο διάλυμα. Συστατικά στοιχεία: Ανθρώπινος ορός (διαλυμένος), οξείδιο του νατρίου < 0,1% (συντηρητικό)	ΝΑΙ
1x	*** EBIFA**	Evans Blue 0,2%	1.5ml	Λευκό καπάκι: Διάλυμα μπλε χρώματος Συστατικά στοιχεία: PBS, Evans Blue. Αραιώστε το Evans Blue 0,2% κατά 1:3000 σε 1x WBIFA	ΟΧΙ
3x	**MMIFA.Bulk**	Μέσο μονιμοποίησης	12ml	Εγκεκριμένο για χρήση με το HELMED® Λευκό καπάκι: άχρωμο διάλυμα Συστατικά στοιχεία: PBS, Γλυκερίνη.	ΝΑΙ
3x	**WBIFA**	Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (10x)	100ml	Λευκό καπάκι: άχρωμο διάλυμα Αραιώστε το συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα κατά 1:10 σε αποσταγμένο νερό (π.χ.: 100 ml + 900 ml). Συστατικά στοιχεία: PBS, οξείδιο του νατρίου (συντηρητικό).	ΟΧΙ
3x	**SBIFA**	Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος	70ml	Λευκό καπάκι: άχρωμο διάλυμα για την αραίωση του ορού του ασθενούς Συστατικά στοιχεία: BSA PBS, οξείδιο του νατρίου (συντηρητικό).	ΝΑΙ

Οι ποσότητες ανά κιτ είναι οι εξής. (*) πρέπει να παραγγελθούν ξεχωριστά

b. Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Αποσταγμένο νερό
2. Δοκιμαστικοί σωλήνες για αραίωση δειγμάτων
3. Δοχείο μέτρησης
4. Ογκομετρική πιπέτα
5. Χρονόμετρο
6. Μικροσκόπιο φθορισμού με σύστημα FITC, (φίλτρο διέγερσης 490nm, φίλτρο αποκοπής 510nm)
7. Δίσκος επώασης
8. Τρυβλίο χρώσης
9. Ρύγχη πιπετών
10. Καλυπτρίδες (24x60 mm)
11. συμπίεση υδροβολέα

Στην περίπτωση κατά την οποία οι πληροφορίες του προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων των ετικετών, είναι ελλιπείς ή εσφαλμένες, επικοινωνήστε με τον κατασκευαστή ή τον προμηθευτή του κιτ δοκιμής.

9. ΦΎΛΑΞΗ ΚΑΙ ΔΙΆΡΚΕΙΑ ΖΩΉΣ

Φυλάσσετε όλα τα αντιδραστήρια σε 2°C - 8°C στα αρχικά τους δοχεία, προστατευμένα από το έντονο φως. Πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ημερομηνία λήξης του κάθε μέρους που υποδεικνύεται στην ετικέτα. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδρστήρια μετά την ημερομηνία λήξης.

Φυλάσσετε όλα τα αντιδραστήρια και τα πλακίδια σε θερμοκρασία 2-8°C, στα αρχικά τους δοχεία. Όταν παρασκευαστούν, τα αραιωμένα διαλύματα είναι σταθερά για τουλάχιστον 1 εβδομάδα σε θερμοκρασία 2-8°C. **Τα αντιδραστήρια και τα πλακίδια πρέπει να χρησιμοποιηθούν μόνο πριν από την ημερομηνία λήψης που αναγράφεται σε κάθε μέρος.**

10. ΥΠΟΔΕΊΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΆΞΕΙΣ ΧΡΉΣΗΣ

a. Δεδομένα κινδύνου για την υγεία

ΑΥΤΟ ΤΟ ΠΡΟΪΟΝ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO.

Ως εκ τούτου, μόνο εκπαιδευμένο προσωπικό και ενημερωμένο ειδικά για τις μεθόδους in vitro διαγνωστικής μπορεί να χρησιμοποιήσει το κιτ. Παρόλο που αυτό το προϊόν δεν θεωρείται ιδιαίτερα τοξικό ή επικίνδυνο σε συνθήκες κανονικής χρήσης, ανατρέξτε στα ακόλουθα για μέγιστη ασφάλεια:

Συστάσεις και προφυλάξεις

Αυτό το κιτ περιέχει δυνητικά επικίνδυνα μέρη. Αν και τα αντιδραστήρια του κιτ δεν ταξινομούνται ως ερεθιστικά για τα μάτια και το δέρμα, συνιστούμε την αποφυγή της επαφής με τα μάτια και το δέρμα και τη χρήση αναλώσιμων γαντιών.

Όλα τα υλικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται για μερικά αντιδραστήρια αυτού του κιτ (έλεγχοι και βαθμονομητές κ.λπ.) έχουν ελεγχθεί με εγκεκριμένες μεθόδους και έχουν βρεθεί αρνητικά για HBsAg, ηπατίτιδα C και HIV. Ωστόσο, καμία εξέταση δεν μπορεί να εγγυηθεί απολύτως την απουσία ιογενών παραγόντων σε τέτοια υλικά. Για το λόγο αυτό, οι έλεγχοι, οι βαθμονομητές του κιτ και τα δείγματα των ασθενών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως δυνητικά υλικά μετάδοσης λοιμωδών νόσων και σύμφωνα με τις εθνικές απαιτήσεις.

Το διαγνωστικό σύνολο περιέχει υλικό ζωικής προέλευσης (αλβουμίνη βοός BSA , ανοσοσφαιρίνη) , όπως αναγράφεται στον πίνακα περιεχομένων, χειριστείτε το ανάλογα με τις εθνικές οδηγίες και απαιτήσεις'.

b. Γενικές οδηγίες χρήσης

1. Μην αναρροφάτε με πιπέτα με το στόμα. Μην καπνίζετε, μην τρώτε και μην πίνετε κατά το χειρισμό του κιτ.
2. Μην αναμειγνύετε ή υποκαθιστάτε αντιδραστήρια από διαφορετικούς αριθμούς παρτίδας. Κάτι τέτοιο ενδέχεται να προκαλέσει μεταβολές των αποτελεσμάτων.
3. Κρατήστε όλα τα δοχεία σφραγισμένα μετά τη χρήση για την αποφυγή βακτηριακής μόλυνσης.
4. Εκτελείτε πάντοτε μεταφορά με πιπέτα όλων των διαλυμάτων με νέα αποστειρωμένα ρύγχη μεταφοράς με πιπέτα.
5. Μην εκθέτετε ποτέ τα μέρη σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 37°C / 98,6°F.

6. Ποτέ μην αφήνετε τις υποδοχές της αντικειμενοφόρου να αποξηραίνονται καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας.
7. 7. Ποτέ μην καταψύχετε τις αντικειμενοφόρους!

Συνιστάται κάθε εργαστήριο να καθιερώσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές με βάση τις τεχνικές, τους ελέγχους , τον εξοπλισμό και τον πληθυσμό ασθενών του, σύμφωνα με τις καθιερωμένες διαδικασίες του εργαστηρίου.

Η οριστική κλινική διάγνωση δεν θα πρέπει να βασίζεται μόνο στα αποτελέσματα των εκτελούμενων εξετάσεων, αλλά θα πρέπει να τίθεται από τον ιατρό μετά από την αξιολόγηση όλων των κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων.

Στην περίπτωση κατά την οποία τα αποτελέσματα των δοκιμών δεν συμφωνούν με τα κριτήρια, η δοκιμή είναι άκυρη και θα πρέπει να επαναληφθεί. Θα πρέπει να ελεγχθούν οι παρακάτω τομείς: Ημερομηνίες λήξης (κατ' εκτίμηση) των αντιδραστηρίων, συνθήκες αποθήκευσης, πιπέτες και άλλα υλικά επεξεργασίας, φωτόμετρο, χρόνοι επώασης και μέθοδος πλύσης. Στην περίπτωση κατά την οποία τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζουν καμία απόκλιση ή άλλου είδους διαφοροποίηση από τις αναμενόμενες τιμές, επικοινωνήστε με τον κατασκευαστή ή τον προμηθευτή σας.

11. ΣΥΛΛΟΓΗ, ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Χρησιμοποιείτε κατά προτίμηση δείγματα ορού που έχουν συλλεχθεί πρόσφατα. Η αιμοληψία πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις εθνικές απαιτήσεις. Συλλέξτε τα δείγματα αίματος με ασηπτικές μεθόδους.

Μη χρησιμοποιείτε λιπαιμικά, ικτερικά, αιμολυμένα ή μικροβιακά μολυσμένα δείγματα.

Σε περίπτωση θολών δειγμάτων, να διεξάγεται φυγοκέντρηση σε χαμηλές στροφές (<1000 x g). Τα δείγματα αίματος πρέπει να συλλέγονται σε καθαρά, στεγνά και άδεια σωληνάρια. Μετά το διαχωρισμό, τα δείγματα ορού πρέπει να χρησιμοποιούνται εντός 8 ωρών, να αποθηκεύονται αντίστοιχα σφιχτά κλεισμένα σε 2-8°C για έως και 48 ώρες ή σε κατάψυξη σε -20°C για μακρύτερες περιόδους. Αποφεύγετε την επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη.

12. ΔΙΕΞΑΓΩΓΉ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΊΑΣ

a. Προετοιμασία

Αφήστε όλα τα συστατικά να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (20 - 26°C) πριν τη χρήση, αναμείξτε καλά και ακολουθήστε το συνιστώμενο σχήμα επώασης για μια βέλτιστη απόδοση της εξέτασης.

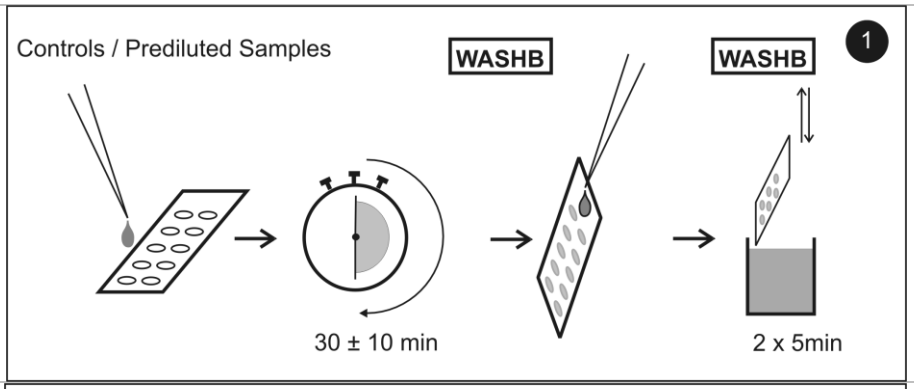
1. Προετοιμασία του Ρυθμιστικού ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης: Αραιώστε το συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα κατά 1:10 σε αποσταγμένο νερό.
2. Αραίωση δειγμάτων: Αραιώστε ορό ασθενούς (για τον τίτλο ελέγχου ανατρέξτε στην ενότητα ***Διαδικασία κιτ*** παραπάνω σύμφωνα με την αναφορά προϊόντος που χρησιμοποιείτε) με 1x ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Αυτά διαφέρουν ανάμεσα στα κιτ HEp-2, nDNA, rLKS, EMA κλπ.
3. Οι μάρτυρες είναι έτοιμοι για χρήση.
4. Προετοιμασία πρωτοκόλλου: Φύλλα ερμηνείας δεδομένων είναι διαθέσιμα στην ενότητα ***Διαδικασία κιτ*** παραπάνω σύμφωνα με την αναφορά προϊόντος που χρησιμοποιείτε.

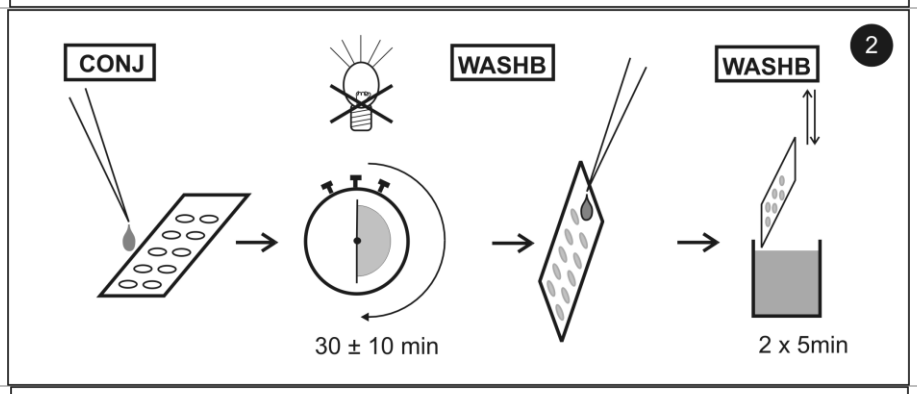
b. Διεξαγωγή δοκιμασίας

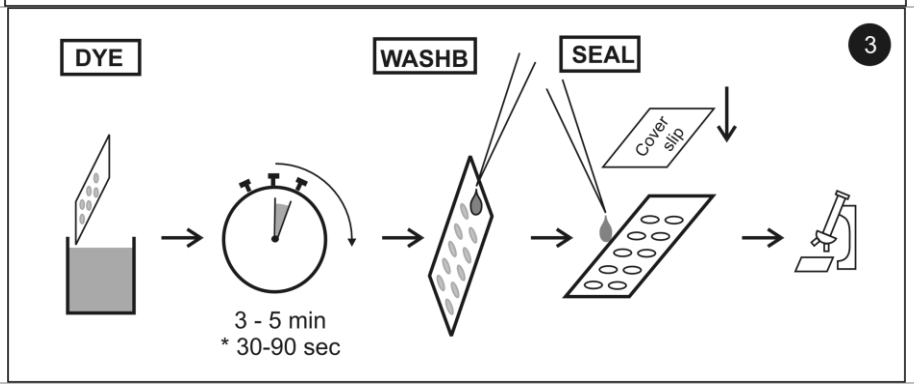
Αρ.	Περιγραφή βημάτων
1.	Αφαιρέστε τις απαιτούμενες αντικειμενοφόρους που απαιτούνται για τη δοκιμασία σας από την προστατευτική συσκευασία και σημαδέψτε τις αναγράφοντας τα στοιχεία. Μην αγγίζετε τις υποδοχές ιστών και κυττάρων. Μην αφήνετε ποτέ τις αντικειμενοφόρους να στεγνώσουν.
2.	**Προετοιμασία του δίσκου θερμοκοιτίδα:** Τοποθετείστε μικρή ποσότητα απεσταγμένου η απιονισμένου νερού σε ένα δοχείο επώασης και τοποθετείστε τα πλακίδια στις ειδικές θέσεις υποστήριξης του δοχείου επώασης. Επωάστε τα πλακίδια 30 ± 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο υγρό δοχείο επώασης. Διατηρείστε σταθερούς χρόνους επώασης με το αντιδραστήριο σύζευξης (conjugate). **Πρώτη επώαση:** Μεταφέρετε με πιπέτα κατάλληλη ποσότητα από κάθε αραιωμένο ορό ασθενή στις κατάλληλες υποδοχές και αποφύγετε τηνεπαφή της πιπέτας με την επιφάνεια της αντικειμενοφόρου. Αποφύγετε την άμεση επαφή της πιπέτας με την επιφάνεια της αντικειμενοφόρου. Φροντίστε κάθε υποδοχή να καλυφθεί πλήρως με τον αντίστοιχο ορό ή έλεγχο. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιήσετε όσο υλικό εξέτασης χρειάζεται για την πλήρη κάλυψη της υποδοχής. Αποφύγετε όμως το να τρέξει μεταξύ των υποδοχών γιατί αυτό ενδέχεται να προκαλέσει λανθασμένα αποτελέσματα.
3.	**Πλύση**: Μετά την επώαση αφαιρέστε τα πλακίδια από το δοχείο επώασης και ξεπλύνετε σύντομα με πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιώντας πλαστικό δοχείο πίεσης. Μην κατευθύνετε την ροή απευθείας στα βυθίσματα. ΣΗΜ: Για να αποφύγετε επιμόλυνση γείρετε το πλακίδιο πρώτα προς την μια σειρά βοθρίων και, προσεκτικά κατευθύνετε την ροή του πλυστικού κατά μήκος της μέσης του πλακιδίου, αφήνοντας το υγρό να τρέξει έξω από την κατώτερη άκρη του πλακιδίου. Στη συνέχεια γυρίστε το πλακίδιο προς την άλλη σειρά βοθρίων, και επαναλάβετε την διαδικασία, επιστρέποντας στο πλυστικό διάλυμα να τρέξει από την νέα άκρη του πλακιδίου. Βυθίστε τα πλακίδια 10 λεπτά σε πλυστικό διάλυμα μέσα σε ειδικό δοχείο χρώσης. Αποφύγετε την άμεση επαφή σκληρών επιφανειών με το υπόστρωμα. Για άριστα αποτελέσματα αλλάξετε το διάλυμα μια φορά μετά από 5 λεπτά. Αφαιρέστε τα πλακίδια από το δοχείο και προσεκτικά αφαιρέστε το πλεονάζον υγρό. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Είναι σημαντικό τα βυθίσματα του πλακιδίου να μην στεγνώσουν κατά την διαδικασία γιατί αυτό μπορεί να βλάψει το υπόστρωμα. Παρακαλούμε μην στεγνώνετε ή αφήνετε το πλακίδιο να μείνει για περισσότερο από μερικά δευτερόλεπτα χωρίς την προσθήκη του φθορίζοντος αντισώματος.
4.	**Δεύτερη επώαση:** Μετά από την πλύση τοποθετείστε την αντικειμενοφόρο πλάκα αμέσως στον υγρό θάλαμο και επικαλύψτε κάθε πεδίο δοκιμασίας με επαρκής ποσότητα της έτοιμης προς χρήση σύζευξης. Η οποία είναι σημασμένη με FITC, έτσι ώστε το πεδίο δοκιμασίας να είναι πλήρως καλυμμένο. Επωάστε τα πλακίδια 30 ± 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι.
5.	**Πλύση:** Μετά την επώαση αφαιρέστε τα πλακίδια από το δοχείο επώασης και ξεπλύνετε σύντομα με πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιώντας πλαστικό δοχείο πίεσης. Μην κατευθύνετε την ροή απ' ευθείας στα βυθίσματα. Πλύνετε τα πλακίδια για 10 λεπτά σε ειδικό δοχείο χρώσης. Για άριστα αποτελέσματα , αλλάξτε το πλυστικό διάλυμα μια φορά μετά από 5 λεπτά.
6.	***Προαιρετική αντιχρώση**: Αραιώστε την αντιχρώση (Evans Blue) 1:3000 σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και αναμείξτε καλά. Κλίνετε την αντιχρώση στο τρυβλίο χρώσης και επωάστε τις αντικειμενοφόρους σε αυτό. Για τις λεπτομέρειες του χρόνου

	επώασης, ανατρέξτε στην ενότητα **Διαδικασία κιτ** παραπάνω σύμφωνα με τα στοιχεία αναφοράς του προϊόντος που χρησιμοποιείτε.Αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους μετά από το χρόνο επώασης και εκπλύνετε σύντομα με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Απομακρύνετε προσεκτικά το υπολειπόμενο πλεόνασμα σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Μη στεγνώνετε την αντικειμενοφόρο με οποιοδήποτε τρόπο.
7.	**Μονιμοποίηση**: Προσθέστε έναν κατάλληλο όγκο μέσου μονιμοποίησης κατά μήκος της μέσης γραμμής κάθε αντικειμενοφόρου. Τοποθετήστε προσεκτικά την καλυπτρίδα στη θέση της, αποφεύγοντας τις φυσαλίδες αέρα.
8.	**Μικροσκοπισμός**: Προβείτε στην ανάγνωση της(ων) αντικειμενοφόρου(ων) με μικροσκόπιο αμέσως σε ολική μεγέθυνση 400 - 800 x με μικροσκόπιο φθορισμού (φίλτρο διέγερσης 490 nm, φίλτρο αποκοπής 510 nm).

c. Ροή εργασιών

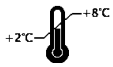
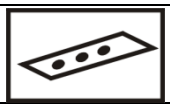






13. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

ΣΦΑΛΜΑ	ΠΙΘΑΝΕΣ ΑΙΤΙΕΣ	ΛΥΣΗ
Χαμηλή πυκνότητα κυττάρων	Κυτταρική λύση μετά από παρατεταμένη επαφή με απιονισμένο νερό. Εκτίναξη ρυθμιστικού διαλύματος απευθείας πάνω στο υπόστρωμα στην υποδοχή.	Ακολουθήστε τη διαδικασία πλύσης
	Προσβολή του ποστρώματος από πρωτεολυτικά ένζυμα	Αδρανοποιείστε τον ορό
Ανομοιογενής φθορισμός	Αποξήρανση ορού στην υποδοχή, ισχυρότερος φθορισμός στην άκρη	Επωάζετε πάντοτε σε υγρό περιβάλλον.
	Ο ορός δεν καλύπτει την υποδοχή εξέτασης	Εφαρμόζετε κατάλληλο όγκο υλικού εξέτασης
	Διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ των υποδοχών	Αποφύγετε το να τρέξει υλικό μεταξύ των υποδοχών στην πρώτη επώαση.
	Η σημείωση της αντικειμενοφόρου με κηρομπογιά προκαλεί μια μεμβράνη στην αντικειμενοφόρο	Χρησιμοποιήστε ένα μολύβι
	Λανθασμένη ρύθμιση μικροσκοπίου	Ελέγξτε τη ρύθμιση του μικροσκοπίου Ελέγξτε την αναμενόμενη διάρκεια ζωής της λάμπας UV.
Διάχυτη εικόνα	Αντικειμενοφόρος που επωάστηκε στο ψυγείο χωρίς κάλυψη	Σφραγίστε την αντικειμενοφόρο με βερνίκι νυχιών ή κηρό παραφίνης.
	Το μικροσκόπιο I.F. έχει λερωθεί. Πιθανές αμυχές στο φακό	Καθαρίστε το μικροσκόπιο σύμφωνα με τις οδηγίες του
Μειωμένος ή καθόλου φθορισμός	Συζυγή και αντικειμενοφόροι που έχουν υποβληθεί σε απόψυξη και εκ νέου κατάψυξη Αραιωμένοι μάρτυρες	Συζυγές και αντικειμενοφόροι αποθηκευμένοι σε 2°C - 8°C / 35 - 46°F.
	Βακτηριακή μόλυνση των ορών ή του συζυγούς	Ελέγξτε τις οδηγίες, χρησιμοποιήστε έτοιμους για χρήση μάρτυρες κιτ.
	Δεν έχει γίνει ρύθμιση του μικροσκοπίου. Πολύ χαμηλή τιμή pH του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (τιμή pH 7,4 ± 0,2)	Ελέγξτε τις συνθήκες
	Έκθεση στο φως του συζυγούς με FITC	Φυλάσσετε το συζυγές προστατευμένο από το φως
Φθορισμός υποβάθρου	-Έχει γίνει λανθασμένη πλύση -Η αντικειμενοφόρος έχει αποξηρανθεί -Λιπαιμικοί, αιμολυμένοι οροί -Σφάλμα μικροσκοπίου	-Ελέγξτε τις οδηγίες πλύσης -Μην αφήνετε τις αντικειμενοφόρους να στεγνώσουν. -Χρησιμοποιείτε μόνο πρόσφατα συλλεγμένους ορούς. -Ελέγξτε την ορθότητα του φίλτρου / αντικειμένου.

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
	¨ Bestellnummer	¨ Αριθμός παραγγελίας
	¨ Número de catálogo	
LOT	¨ Descrizione lotto	¨ Lot
	¨ Lot	¨ Lote
	¨ Chargen Bezeichnung	¨ Χαρακτηρισμός παρτίδας
	¨ Lote	
CE	¨ Conformità europea	¨ EC Declaration of Conformity
	¨ Déclaration CE de Conformité	¨ Declaración CE de Conformidad
	¨ Europäische Konformität	¨ Ευρωπαϊκή συμφωνία
	¨ Déclaracão CE de Conformidade	
	¨ Rispettare le istruzioni per l'uso	¨ See instructions for use
	¨ Voir les instructions d'utilisation	¨ Ver las instrucciones de uso
	¨ Gebrauchsanwesung beachten	¨ Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης
	¨ Ver as instrucões de uso	
	¨ Da utilizzarsi entro	¨ Use by
	¨ Utilise avant le	¨ Utilizar antes de
	¨ Verwendbar bis	¨ Χρήση μέχρι
	¨ Utilizar antes de	
	¨ Conservare a 2-8°C	¨ Store at 2-8°C (35-46°F)
	¨ Conserver à 2-8°C	¨ Conservar a 2-8°C
	¨ Lagerung bei 2-8°C	¨ Φυλάσσεται στους 2-8°C
	¨ Conservar entre 2-8°C	
	¨ 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	¨ Solucão de lavagem
	¨ Waschpuffer	¨ Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	¨ Solución de lavado	
SB 1x	¨ Tampone di campione	¨ Sample Buffer
	¨ Tampon de Echantillons	¨ Solucão de Muestras
	¨ Probenpuffer	¨ Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	¨ Solución de Muestras	
Σ XX	¨ XX determinazioni	¨ XX tests
	¨ XX tests	¨ XX pruebas
	¨ XX Bestimmungen	¨ XX προσδιορισμοί
	¨ XX Testes	