

# Imuno-CON ANA-HEp-2

*Kit para determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos antinucleares (ANA) no soro humano, por imunofluorescência indireta.*

*An indirect immunofluorescence kit for the qualitative and semi-quantitative detection of antinuclear antibody (ANA) in human serum.*

*Kit para la determinación cualitativa y semi-cuantitativa de anticuerpos antinucleares (ANA) en el suero humano, por inmunofluorescencia indirecta.*

**REF 12100-I-100** *determinações / determinins / determinaciones*

**REF 12200-I-200** *determinações / determinins / determinaciones*

**WAMA Diagnóstica**

Rua Aldo Germano Klein, 100 - CEAT  
CEP 13560-971 - São Carlos - SP - Brasil  
Fone 55 16 3377.9977 / Fax 55 16 3377.9970  
www.wamadiagnostica.com.br

**Obelis S.A.**

Boulevard Général Wahis 53  
1030 Brussels, BELGIUM  
Phone. +\*(32) 2 732-59 54  
Fax : +\*(32) 2 732-60 03  
www.obelis.net

## PORTUGUÊS

#### IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Os anticorpos antinucleares (ANA) são comumente encontrados no soro de pacientes com doença do tecido conjuntivo. Perfis distintos de ANA estão associados a certos distúrbios e são considerados marcadores para algumas doenças. Por exemplo, anticorpos ao antígeno Smith (anti-Sm) e ao DNA (anti-DNA) estão altamente associados ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), enquanto os anticorpos anticentrômeros estão associados a uma forma limitada de esclerodermia, a variante CREST. Os ANAs são mais apropriadamente denominados auto-anticorpos, porq,ue, em certas doenças reumáticas, eles são também dirigidos a componentes celulares extranucleares, como elementos citoplasmáticos e do citoesqueleto.

Em 1982, a American Rheumatism Association incluiu um teste positivo para ANA como um dos critérios para o diagnóstico de LES. Logo, um resultado negativo descarta um LES, porém não é específico, já que pacientes com outras enfermidades do tecido conjuntivo, tais como artrite reumatóide, esclerodermia, síndrome de Sjögren e dermatomiosite são frequentemente ANA positivos. Além do que, ANA positivo com títulos baixos também pode ser encontrado em infecções, neoplasias e indivíduos normais com idade avançada. A imunofluorescência indireta é o método de referência para ANA, onde se utiliza, como substrato, corte de tecido (fígado ou rim de rato) ou células epiteliais humanas (HEp-2). Ao contrário do corte do tecido, as células HEp-2 expressam a maioria dos antígenos de importância clínica, inclusive centrômero, Ro (SSA), La (SSB), Scl-70, ANCP etc. Os reagentes deste kit estão ajustados para detectar anticorpos clinicamente relevantes, usando como substrato células HEp-2 e conjugado IgG, os quais eliminam resultados falsos positivos fisiológicos que ocorrem normalmente devido a baixos títulos de IgM específica.

#### PRINCÍPIO DO MÉTODO

Anticorpos antinucleares presentes no soro se ligam ao substrato antígeno (células HEp-2) e são revelados por uma antiagmaglobulina específica marcada com isotiocianato de fluoresceína

#### APRESENTAÇÃO DO KIT

**REF 121004** (100 determinações)

- Lâminas com 10 áreas reativas de células HEp-2 (10 lâminas)
- Antigamaglobulina G marcada com isotiocianato de fluoresceína (1x5ml)
- Tampão fosfato-salino (PBS) 20 x concentrado (1x50ml)
- Glicerina tamponada (1x4ml)
- Soro controle positivo homogêneo (1x0,5ml)
- Soro controle positivo centromérico (1x0,5ml)
- Soro controle negativo (1x1ml)
- Azul de Evans (1x2ml)
- Laminulas (10 unidades)
- Instruções para uso

**REF 122004** (200 determinações)

- Lâminas com 10 áreas reativas de células HEp-2 (20 lâminas)
- Antigamaglobulina G marcada com isotiocianato de fluoresceína (2 x 5ml)
- Tampão fosfato-salino (PBS) 20 x concentrado (2 X 50ml)
- Glicerina tamponada (2x4ml)

- Soro controle positivo homogêneo (1x1ml)
- Soro controle positivo centromérico (1x1ml)
- Soro controle negativo (1x1ml)
- Azul de Evans (1x2ml)
- Laminulas (20 unidades)

10. Instruções para uso

#### PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

- LÂMINAS COM CÉLULAS HEp-2 (1):** deivá-las em temperatura ambiente por 15 minutos, antes de retirá-las do envelope. Estáveis em geladeira (2-8°C), até a data do vencimento.
- ANTIGAMAGLOBULINA HUMANA (IGG) MARCADA (2):** pronta para uso. Estável em geladeira (2-8°C), até a data do vencimento. Proteger da luz. Contém azida sódica 0,95%.
- TAMPÃO FOSFATO-SALINO (PBS) 20 x CONCENTRADO (3):** diluir o PBS concentrado com água destilada/deionizada: 1 parte do PBS + 9 partes de água destilada/deionizada. Conservar em geladeira, em recipiente limpo e fechado. É estável por 1 mês. Descartar se ocorrer turvação. O PBS diluído é usado como tampão de lavagem e diluente das amostras do paciente.
- GLICERINA TAMPONADA (4):** pronta para uso. Estável em geladeira (2-8°C), até a data do vencimento. **NÃO CONSERVAR** em temperaturas inferiores a 2°C para evitar cristalização.

Contém azida sódica 0,95%.

- SORO CONTROLE POSITIVO HOMOGENEO (5):** pronto para uso. Manter em geladeira (2-8°C). Contém azida sódica 0,095%. Estável até a data do vencimento.
- SORO CONTROLE POSITIVO CENTROMÉRICO (6):** pronto para uso. Manter em geladeira (2-8°C). Contém azida sódica 0,095%. Estável até a data do vencimento.
- SORO CONTROLE NEGATIVO (7):** pronto para uso. Manter em geladeira (2-8°C). Contém azida sódica 0,095%. Estável até a data do vencimento.
- AZUL DE EVANS (8):** pronto para uso. Conservar em geladeira (2-8°C). Estável até a data do vencimento.

**Obs.:** O kit mantém o mesmo desempenho após a primeira utilização e é estável até a data de validade descrita no rótulo, desde que seja mantido na temperatura indicada (2-8°C).

#### AMOSTRAS

Soro livre de hemólise, lipemia e contaminação. Os soros podem ser conservados em geladeira (2-8°C) até 72 horas. Para um tempo maior, devem ser guardados em freezer a -20°C. Evitar repetidos congelamentos e descongelamentos.

#### MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Microscópio de fluorescência
- Tubos de ensaio
- Pipetas sorológicas
- Jarra de Coplin ou similar
- Água destilada ou deionizada
- Frasco para 1 litro
- Câmara de incubação
- Papel absorvente

#### PROCEDIMENTO

**a) Teste Qualitativo (screening):** para triagem e eliminação dos soros não-reagentes.

- Diluir o soro de cada paciente a 1/40 com tampão PBS diluído (3) (10ml de soro + 390ml de tampão PBS diluído).
- Deixar a(s) lâmina(s) atingir(em) a temperatura ambiente por 15 minutos, antes de retirá-la(s) do envelope. Removê-la(s), sem tocar no substrato, rotulá-la(s) e colocá-la(s) em câmara úmida.
- Pingar 1 gota dos controles positivo homogêneo (5), positivo centromérico (6) e negativo (7), **sem diluir** nas áreas 1, 2 e 3 da(s) lâmina(s), respectivamente. Evitar transbordar as áreas.

- Pingar 1 gota dos soros desconhecidos, diluídos 1/40 nas áreas restantes, evitando transbordar.
- Incubar na câmara úmida por 30 minutos, em temperatura ambiente.
- Remover a(s) lâmina(s) da câmara úmida. Segurá-la(s) por uma extremidade e lavá-la(s) com aproximadamente 10ml de tampão PBS diluído (3). Usando uma pipeta, dirigir o PBS pela borda longitudinal da lâmina, tendo o cuidado de não atingir diretamente as áreas reativas, evitando, com isso, prejudicar o substrato. Colocar a(s) lâmina(s) em uma jarra de Coplin ou similar e lavá-la(s) 2 vezes com PBS diluído (3), por 5 minutos cada vez, agitando suavemente o Coplin algumas vezes.
- Remover a(s) lâmina(s) do Coplin, uma de cada vez. Tirar o excesso de PBS, sacudindo-a(s) sobre papel absorvente. Secar em torno das áreas reativas e ir **IMEDIATAMENTE** para a etapa 8 para não secar o local da reação. A SECAGEM DO SUBSTRATO AFETARÁ SÉRIAMENTE OS RESULTADOS.
- Retornar à câmara úmida. Pingar 1 gota da antiagmaglobulina marcada (2) em cada área da(s) lâmina(s), tendo o cuidado de cobri-las totalmente.
- Incubar em câmara úmida por 30 minutos, em temperatura ambiente, protegendo do excesso de luz.
10. Remover a(s) lâmina(s) da câmara úmida e mergulhá-la(s) em uma jarra de Coplin ou similar contendo PBS, para remover o excesso de conjugado. Transferir a(s) lâmina(s) para outra jarra de Coplin ou similar com PBS diluído e lavá-la(s) 2 vezes, por 5 minutos cada vez, agitando suavemente o Coplin algumas vezes. Pingar 2 a 3 gotas de azul de Evans (8) no Coplin desta última lavagem.
11. Remover a(s) lâmina(s) do Coplin, uma de cada vez. Tirar o excesso de PBS, sacudindo-a(s) sobre papel absorvente. Secar em torno das áreas reativas e ir **IMEDIATAMENTE** para a etapa 12 para não secar o local da reação.
12. Pingar 3 a 4 gotas de glicerina tamponada (4) entre as áreas reativas. Cobrir a(s) lâmina(s) com laminula(s), evitando a formação de bolhas. Secar o excesso da glicerina com papel absorvente. Limpar o dorso da lâmina.
13. Ler em microscópio de fluorescência. É conveniente fazer a leitura no mesmo dia. Entretanto, no caso de não ser possível, conservá-la(s) em geladeira (2-8°C), protegida(s) da luz (no escuro), por até 1 semana, sem perda significante da fluorescência.
- b) Teste Semi-Quantitativo:** (titulação): para determinar o título de anticorpos dos soros positivos no teste screening.
  - Diluir os soros positivos com tampão PBS diluído (3), obedecendo à razão 2. Exemplo: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:2000, ..., 1:2560 ou mais
  - Deixar a(s) lâmina(s) atingir(em) a temperatura ambiente por 15 minutos antes de retirá-la(s) do envelope. Removê-la(s) sem tocar no substrato, rotulá-la(s) e colocá-la(s) em câmara úmida.
  - Pingar 1 gota dos controles positivo homogêneo (5), positivo centromérico (6) e negativo (7), sem diluir nas áreas 1, 2 e 3 da(s) lâmina(s), respectivamente. Evitar transbordar as áreas.
  - Pingar 1 gota do(s) soro(s) diluído(s) do(s) paciente(s) nas áreas restantes, usando uma área para cada diluição. Evitar transbordar as áreas.
  - Seguir as etapas de 5 a 13 do teste de triagem (screening).

#### RESULTADO DAS LEITURAS

**Reação Negativa:** AUSÊNCIA de fluorescência verde-maçã característica. A imagem nuclear da amostra deve ser sempre igual ao controle negativo.

**Reação Positiva:** PRESENÇA de fluorescência verde-maçã característica. A imagem nuclear e/ou citoplasmática da amostra é de fluorescência maior que o controle negativo.

#### INTERPRETAÇÃO

**1. Padrão Homogêneo:** é uma sólida coloração de todo núcleo em interfase, com ocasionais núcleos negativos. A região cromossômica das células em metáfase é positiva. Os antígenos nucleares em ordem decrescente de frequência são: DNP, histona, DNA de dupla hélice fita (dsDNA/ssDNA).

**Interpretação:** títulos altos são sugestivos de LES idiopático e um teste mais específico e quantitativo para anti-DNA deve ser realizado. Títulos mais baixos ocorrem, ocasionalmente, na artrite reumatóide e no LES idiopático e induzido por drogas.

**2. Padrão Periférico:** é uma sólida coloração ao redor da membrana nuclear, com débil coloração no centro do núcleo, em interfase. A região cromossômica das células mitóticas é positiva, como no padrão homogêneo. Os antígenos são principalmente DNA de dupla hélice e raramente DNA de fita simples, DNP ou histonas.

**Interpretação:** títulos altos são sugestivos de LES idiopático, devendo ser realizadas determinações específicas e quantitativas de anti-DNA. Títulos baixos sugerem outras doenças de tecido conjuntivo.

**3. Padrão Pontilhado:** observa-se uma coloração fina ou granulosa de tamanho uniforme ou variável no núcleo em interfase, geralmente sem coloração concomitante do nucleolo. Os cromossomos são, frequentemente, negativos, mas a região fora da área cromossômica cora- de modo variável, dependendo dos antígenos. Os antígenos nucleares para este padrão incluem Sm, RNP, Scl-70, SS-B/La, SS-A/Ro e muitos outros antígenos anticorpos. **Interpretação:** presença de Sm sugere LES. RNP pode estar presente em doença mista do tecido conjuntivo, miostre, esclerodermia ou LES, Scl-70, na esclerodermia, SS-B/La e SS-A/Ro, na síndrome de Sjögren, embora o SS-A/Ro possa dar padrões diferentes de coloração.

**4. Padrão Nuclear:** observam-se grânulos espessos dentro do núcleo, geralmente menos que 6 por células, com ou sem ocasionais finas granulações. A região cromossômica das células mitóticas é negativa. Antígenos nucleolares podem apresentar diferentes relações de locais com o ciclo celular. Os antígenos são Pm-Scl, nucleolin, Ku e outros desconhecidos.

**Interpretação:** ocorre no fenômeno de Raynaud e outras formas de esclerodermia e suas variantes, mas raramente no LES. Altos títulos podem estar associados, além da esclerodermia, à síndrome de Sjögren e ao fenômeno de Raynaud. **5. Padrão Centromérico:** é o único que pode ser fidecimentamente definido. Observa-se nele uma coloração ligeiramente granular, geralmente múltiplo de 46, muito discreta. Na HEp-2 ocorre coloração característica das células mitóticas na área cromossômica e no núcleo interfásico.

**Interpretação:** o anticorpo anti-centrômero é altamente sugestivo de uma variante de esclerodermia chamada CREST (calcinose, fenômeno de Raynaud, dismotilidade esofágica, esclerodactilia e telangiectasia).

**6. Padrão Mitocondrial:** grosseiros grânulos irregulares, estendendo-se em forma de filamentos do núcleo para todo o citoplasma. O antígeno envolvido é o M2.

**Interpretação:** este padrão é comum na cirrose biliar primária e muito raro em doença do tecido conjuntivo.

#### LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Em alguns casos, soros positivos para fluorescência nuclear, tanto podem ser frac-reagentes ou negativos na diluição inicial (fenômeno prozona). Em tais casos duvidosos, o soro deve ser triado a diluições mais altas, e, se positivo, os títulos de anticorpos devem ser determinados.

Um alto título de ANA sugere uma enfermidade do tecido conjuntivo. Porém, nem todo ANA positivo deve ser considerado diagnóstico. Os resultados do teste deverão ser analisados junto com outros resultados sorológicos, como também, com o exame clínico do paciente.

Uma mesma amostra pode apresentar dois ou mais tipos de padrões de fluorescência. Este fenômeno pode ser observado quando a amostra é titulada até seu ponto final.

A incidência de ANA positivo aumenta com a idade do paciente, bem como pode ocorrer em uma pequena proporção de pacientes com doenças infecciosas e/ou neoplásicas. Combinações de auto-anticorpos podem induzir a padrões homogêneos e/ou pontilhados e, portanto, é recomendado que testes específicos para anti-dsDNA e ENA (antígenos nucleares extraíveis) sejam realizados em todas as amostras com padrão homogêneo.

A fonte de luz, filtros e a óptica das diferentes marcas de microscópios de fluorescência influenciam a sensibilidade do teste.

#### PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

1. Reagentes somente para uso diagnóstico *in vitro*.

2. O kit deverá ser conservado em geladeira entre 2-8°C.

3. A conservação das lâminas pode ser feita selando as bordas da laminula com esmalte de unha e guardando-as no escuro entre 2-8°C por, no máximo, 2 meses.

4. Como se em azida sódica a 0,095% como conservante, o descarte dos reagentes deve ser acompanhado de grandes volumes de água para evitar o acúmulo de resíduos de azida no encanamento, pois esta pode reagir com chumbo ou cobre formando sais altamente explosivos. Além disso, a azidê é tóxica quando ingerida.

- Todos os materiais humanos usados na preparação dos controles foram testados, com resultados negativos para anticorpos anti-HIV, anti-HCV e antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg), porém, como nenhum método diagnóstico oferece completa segurança da ausência destes e de outros agentes infecciosos, recomenda-se tratar os soros controles como materiais potencialmente infecciosos.
- Não substituir componentes deste kit com o de outros fabricantes, nem usar componentes de lotes e códigos diferentes.
- Descarte o material de acordo com as regulamentações locais.
- Descarte o material conforme regulamentações locais.
- Realizar manutenção periódica do microscópio, pois a extrapolação da vida útil da lâmpada poderá prejudicar a análise dos resultados.
- Seguir as boas práticas laboratoriais (BPLs) na conservação, manuseio e descarte dos materiais.

#### TERMO DE GARANTIA

A WAMA DIAGNÓSTICA garante a troca deste conjunto diagnóstico, desde que o mesmo esteja dentro do prazo de validade e que seja comprovado por sua assessoria técnica que não houve falhas na execução, manuseio e conservação deste produto. A WAMA e seus distribuidores não se responsabilizam por falhas no desempenho do kit sob essas condições.

## ENGLISH

#### SUMMARY

Antinuclear antibodies (ANA) are present in the serum of patients with connective tissue

disorders.

Antinuclear antibodies (ANA) are related to certain disturbs and they are regarded as markers for some diseases. For example, antibodies against Smith antigen (anti-Sm) and against DNA (anti-DNA) are highly associated to Systemic Lupus Erythematosus (SLE) whereas the anti-centromere antibodies are associated to a limited form of scleroderma, variant CREST. ANAs are regarded as auto-antibodies because in some rheumatic diseases they are also directed to components of extranuclear cells such as cytoplasmatic elements and cyto-skeletal.

In 1982, American Rheumatism Association included a positive test for ANA as a criterion for Systemic Lupus Erythematosus (SLE) diagnosis. Therefore, a negative result discard SLE, however, it is not specific, since patients with connective tissue disorders such as arthritis rheumatoid, sclerodermia, Sjogren Syndrome and dermatomiositis are frequently ANA positive. Besides, positive ANA with low titers can also be found in infections, neoplasia and on healthy elderly people.

Indirect immunofluorescence method is considered to be the standard for ANA, in which tissue cut (mouse's liver or kidney) or human epithelial cells (HEp-2) is used as substrate. HEp-2 cells, unlike tissue cut, express almost all antigens, including centromere, Ro (SSA), La (SSB), Scl-70, ANCP etc.

The reagents of this kit are aimed at detecting important antibodies by using HEp-2 cells and IgG conjugate as substrate which eliminate physiological false positive results normally present due to low titers of specific IgM.

**PRINCIPLE OF THE METHOD**
Antinuclear antibodies present in the serum bind to the antigenic substrate (HEp-2 cells) and they are detected by an antigramma globulin labelled with FITC.

#### KIT PRESENTATION

**REF 121004** (100 determinations)

- 10-well HEp-2 cells Slide (10 slides).
- FITC IgG conjugate (1x5ml).
- Phosphate Buffered Saline (PBS) 20x (1x50ml).
- Mounting Medium (1x4ml)
- Homogeneous positive control serum (1x0,5ml)
- Centromere positive control serum (1x0,5ml)
- Negative control serum (1x1ml)
- Evans blue (1x2ml)
- Cover slips (10 unidades)
- Package insert

**REF 122004** (200 determinations)

- 10-well HEp-2 cells Slide (20 slides).
- FITC IgG conjugate (2x5ml).
- Phosphate Buffered Saline (PBS) 20x (2x50ml).
- Mounting Medium (2x4ml)
- Homogeneous positive control serum (1x1ml)
- Centromere positive control serum (1x1ml)
- Negative control serum (1x1ml)
- Evans blue (1x2ml)
- Cover slips (20 unidades)
- Package insert

#### REAGENT STABILITY AND STORAGE

- 10-WELL HEp-2 CELLS SLIDE (1):** Let the pouch reach to room temperature for 15 minutes, then remove the slide. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date.
- FITC IGG CONJUGATE (2):** Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date. Protect from light. It contains sodium azide 0.095%
- PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS)20x (3):** Dilute PBS on distilled or deionized water. 1 PBS + 19 distilled or deionized water. Stable for 1 month if stored at 2-8°C in a clean and sealed container. Discard if turbidity is present. Diluted PBS is used as washing buffer and diluent for patient specimens.

Stable in refrigerator for 12 months. Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date. **DO NOT STORE** below 2°C to avoid crystallization. It contains sodium azide 0.095%.

**•HOMOGENEOUS POSITIVE CONTROL SERUM (5):**Ready for use. Store at 2-8°C. Stable up to expiration date. It contains sodium azide 0.095%

**•CENTROMERE POSITIVE CONTROL SERUM (6):** Ready for use. Store at 2-8°C. Stable up to expiration date. It contains sodium azide 0,095%.

**• NEGATIVE CONTROL SERUM (7):** Ready for use. Store at 2-8°C. Stable up to expiration date. It contains sodium azide 0.095%

**• EVANS BLUE (8):** Ready for use. Store at 2-8°C. Stable up to expiration date.

**Note.** The kit retains the same performance after first use and is stable until the expiration dara described on the label, provided it is kept at the indicated temperature (2-8 °C).

#### SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly haemolysed, lipaemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used. Store serum at 2-8°C up to 72 hours. For longer storage, the serum should be stored in a freezer.

Avoid repeated thawing and freezing of specimens.

#### MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Fluorescence microscope
- Micropipette
- Test tube
- Serological pipettes
- Coplin jar or similar
- Distilled or deionized water
- 1 liter container
- Incubation chamber
- Papertowel

#### PROCEDURE

**Qualitative Test (screening):** It is intended to screening and removal of negative serum.

- Dilute patient serum 1:40 with diluted PBS (3) (10µl of serum + 390µl of diluted PBS).
- Allow the pouch reach to room temperature for 15 minutes, then remove slide. Carefully remove the slide without touching on the substrate. Label it and store in the moisture chamber.
- Add 1 drop of homogeneous positive control (5), centromere positive (6) and negative control serum (7), undiluted, in the wells 1, 2 and 3 respectively. Avoid overfilling the wells.
- Add 1 drop of unknown serum diluted at 1:40 in the remaining wells. Avoid overfilling the wells.
- Incubate the slide for 30 minutes at room temperature.
- Remove the slide from the incubation chamber. Hold the slide at tab end and rinse it using 10ml PBS (3). With a pipette, label PBS by the longitudinal edge of the slide. Be sure not to touch reagent wells to avoid damaging the substrate. Transfer the slide into the Coplin jar or similar and wash it twice with diluted PBS (3), for 5 minutes, gently shake the jar.
- Remove the slide from the Coplin jar, one by one. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove PBS excess. Dry around reactive wells. To prevent slide wells from drying, go

IMMEDIATELY to step 8.  
**SUBSTRATE DRYING MAY AFFECT THE RESULTS.**  
 8. Place the slide back to incubation chamber. Apply 1 drop of FITC IgG conjugate (2) in each well. Be sure to fill the well completely.  
 9. Incubate the slide for 30 minutes at room temperature. Protect it from light.  
 10. Remove the slide from incubation chamber then transfer it into a Coplin jar or similar with PBS to remove conjugate excess. Transfer the slide to another Coplin jar or similar with diluted PBS and wash twice for 5 minutes each. Gently shake the jar. Apply 2 to 3 drops of Evans blue (8) into Coplinjar in this last washing.  
 11. Remove the slide from Coplin jar, one by one. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove PBS excess. Dry around reactive wells. To prevent wells from drying, go IMMEDIATELY to step 12.  
 12. Apply 3 to 4 drops of Mounting Medium (4) in the reactive wells. Cover the slide with cover slip. Avoid air bubbles. Dry the excess of Mounting Medium with a paper towel.  
 13. Slide must be read under a fluorescence microscope as soon as possible. However, if it is not possible, store the slide at 2-8°C and protect it from light (dark room) for up to a week.

b. **Semi-quantitative Test.** (Titration): It is intended to determine the titers of antibodies for positive serum through the screening test.  
 1. Dilute positive serum with diluted PBS (3) following ratio 2. Ex: 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, ... 1:2560 and so on.  
 2. Allow the pouch equilibrate room temperature for 15 minutes, then remove the slide. Carefully remove the slide without touching on the substrate. Label it and store in the incubation chamber.  
 3. Add 1 drop of homogeneous positive control (5), centromere positive (6) and negative (7), undiluted, on1, 2 and 3 wells respectively. Avoid overfilling the wells.  
 4. Add 1 drop of patient's diluted serum in the other wells, using one well for each dilution. Avoid overfilling the wells.  
 5. Follow the steps 5 through 13 of the screening tests.

**READING OF RESULTS**

**Negative:** ABSENCE of a typical apple-green fluorescence color. The nuclear image of the specimen should be always similar to that of negative control.

**Positive:** PRESENCE of a typical apple-green fluorescence color. The nuclear and/or cytoplasmatic image of the specimen is more fluorescent than that of negative control.

**INTERPRETATION.**

**1. Homogeneous pattern:** A solid color of all nucleus in interphase, with occasional negative nucleus. Chromosomal region of the cells in metaphase is positive. Nuclear antigens in decrescent order of frequency are: DNP, histone, DNA double/simple strip (dsDNA/ssDNA). **Interpretation:** High titers are suggestive of idiopathic SLE and a test for anti-DNA more specific and quantitative should be performed. Low titers are present, occasionally, in rheumatoid arthritis, idiopathic LES and induced by drugs.

**Peripheral pattern:** A solid color around the nuclear membrane with weak color in the core of the nucleus, in interphase. Chromosomal region of mitotic cells is positive, like homogeneous pattern. Antigens are DNA double spiral and rarely DNA simple strip, DNP or histone.

**Interpretation:** High titers are suggestive of idiopathic LES. Specific and quantitative determinations of anti-DNA should be performed. Low titers suggest other conjunctive tissue diseases.

**3. Dotted pattern:** Granulou or thin color, uniform or variable size of the nucleus in interphase is visible, normally colorless nucleolus. The chromosomes are negative, but the outside region of the chromosomal area presents variable color depending of antigens. Nuclear antigens are Sm, RNP, Scl-70, SS-B/La, SS-A/Ro and many other antigen-antibody systems.

**Interpretation:** Sm presence suggests SLE. RNP may be present in combinated diseases of the conjunctive tissue, myositis, scleroderma or SLE, Scl-70 in the scleroderma, SS-B/La and SS-A/Ro in the Sjogren syndrome, although SS-A/Ro can present different patterns of color.

**4. Nucleolar pattern:** Thick granulous inside the nucleus is visible, normally less than 6 per cell with or without thin granulous. The chromosomal region of mitotic cells is negative. Nuclear antigens can present different sites with cellular cycle. Antigens are Pm-Scl, nucleolin, Ku and others unknown.

**Interpretation:** It occurs on Reynaud phenomenon and other ways of scleroderma and its variant, but rarely on SLE. High titers can be linked, besides scleroderma, to Sjogren syndrome.

**5. Centromere pattern:** Only pattern regarded as defined. A slight granular color, multiple of 46, very discreet and observed. In the Hep-2 occurs a typical color of mitotic cells in the cromosomal area and in the interphase nucleus.

**Interpretation:** Anti-centromere antibody is highly suggestive of a scleroderma variant known as CREST (calcinosis, Reynaud fenomeno, dissimilitiy of oesophagus, sclerodactilia and telangiectasis)

**Mitochondrial pattern:** Irregular thick granules, in filaments format through all cytoplasm. Antigen is M2.

**Interpretation:** This pattern is typical in primary bilial cirrose and rare on conjunctive tissue disease.

**METHOD LIMITATION**

In some cases, positive serum for nuclear fluorescence are weak reagent or negative in the initial dilution (prozone effect). In such doubtful cases, the serum should be screened to higher dilutions, and, if positive, the titers of the antibodies should be determined. A high titer for ANA suggests a conjunctive tissue disease. But not all positive ANA should be regarded as diagnostic. The test results should be evaluated together with other serological results as well as patient's clinical assay. The same specimen can present two or more types of fluorescence patterns. This phenomenon can be observed when the specimen is stored up to its end point.

The incidence of positive ANA increases with the patient's age. This incidence can also occur in a small proportion of patients with infectious and/or neoplastic diseases.

Combinations of auto-antibodies can induce to homogeneous and/or dotted patterns and therefore, it is recommended that specific tests for anti-dsDNA and ENA are performed with all homogeneous pattern specimens.  
 Fluorescence microscopes with different light source, filters and optic and also from different brands can affect sensitivity of the tests.

**PRECAUTIONS AND WARNINGS**

1. For in vitro Diagnostic use only.  
 2. The kit should be stored at 2-8°C.  
 3. The conservation of the slide is done by sealing the coverslip edge with nail varnish and storing at 2-8°C in a dark room, for 2 months.  
 4. Sodium Azide 0.095% is used and it can react with lead and cooper plumbing forming highly explosive metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide is toxic if ingested.

5. All human components have been tested for HBSAg, anti-HIV, anti-HCV and found to be negative. However, this does not assure the absence of these and other infectious diseases. All human components should be handled as potentially hazardous.

6. Do not interchange kit components with those from sources other than the same code number from WAMA/DIAGNOSTICA.  
 7. Do not use components beyond their expiration date.  
 8. Dispose in accordance with local regulations.  
 9. The periodical maintenance of the microscope is recommended since an expired lamp can interfere in the result analysis.  
 10. Follow good laboratory practices (GLP) related to storage, dispensing and material disposal.

**WARRANT**  
 WAMA Diagnóstica replaces this kit since it is not beyond expiration date. The returned kit must be evaluated by Wama's technical support. The warranty will be invalid and kit will not be replace if technical support finds evidence that running, handling and storage were not properly followed.

## ESPAÑOL

**IMPORTANCIA CLÍNICA**

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son comúnmente encontrados en el suero de pacientes con enfermedad del tejido conjuntivo. Perfiles distintos de ANA están asociados a ciertos disturbios y son considerados marcadores para algunas enfermedades. Por ejemplo, anticuerpos al antígeno Smith (anti-Sm) y al DNA (anti-DNA) están altamente asociados al Lúpus Eritematoso Sistémico (LES), mientras los anticuerpos anticentromeros están asociados a una forma limitada de esclerodermia, la variante CREST. Los ANAs son más abundantes en los denominados auto anticuerpos porque, en ciertas enfermedades reumáticas, ellos son también dirigidos a componentes celulares extra nucleares, como elementos citoplasmáticos y del cito esqueleto.

En 1982, la American Rheumatism Association incluye el teste positivo para ANA como uno de los criterios para diagnóstico de LES. Luego, un resultado negativo, descarte un LES, pues no es específico, ya que pacientes con otras enfermedades del tejido conjuntivo, tales como artritis reumatoideas, esclerodermia, síndrome de Sjogren y dermatomiositis son frecuentemente ANA positivos. Además, ANA positivo con títulos bajos también puede ser encontrado en infecciones, neoplasias y individuos normales con edad avanzada. La inmunofluorescencia indirecta es el método de referencia para ANA, donde se utiliza, como sustrato, corte del tejido (hígado o riñón de rato) o células epiteliales humanas (HEp-2). Al contrario del corte del tejido, las células HEp-2 expresan la mayoría dos antígenos de importancia clínica, inclusive centromero, Rnt(SSA), La(SSB), Scl-70, ANCP, etc.

Los resultados de este kit están sujetos a anticuerpos para detectar anticuerpos clínicamente relevantes, usando como sustrato células HEp-2 y conjugado IgG, los cuales eliminan resultados falso positivos fisiológicos que ocurren normalmente debido a bajos títulos de IgM específica.

**PRINCIPIO DEL MÉTODO**

Anticuerpos antinucleares presentes en el suero se ligan al sustrato antigénico (células HEp-2) y son revelados por una antimaglobulina específica marcada con isotiocianato de fluoresceína.

**PRESENTACIÓN DEL KIT**

**12100-I (100 determinaciones)**

1. Laminas con 10 áreas reactivas de células HEp-2 (10 laminas)  
 2. Antimaglobulina G marcada con isotiocianato de fluoresceína (1x5ml)  
 3. Tapón fosfato salino (PBS) 20x concentrado (1x50ml)  
 4. Glicerina taponada (1x4ml)  
 5. Suero control positivo homogéneo (1x0,5ml)  
 6. Suero control positivo centromérico (1x0,5ml)  
 7. Suero control negativo (1x1ml)  
 8. Azul de Evans (1x2ml)  
 9. Laminuelas (10 unidades)  
 10. Instrucciones para el uso

**12200-I (200 determinaciones)**

1. Laminas con 10 áreas reactivas de células HEp-2 (20 laminas)  
 2. Antimaglobulina G marcada con isotiocianato de fluoresceína (2x5ml)  
 3. Tapón fosfato salino (PBS) 20x concentrado (2x50ml)  
 4. Glicerina taponada (2x4ml)  
 5. Suero control positivo homogéneo (1x1ml)  
 6. Suero control positivo centromérico (1x1ml)  
 7. Suero control negativo (1x1ml)  
 8. Azul de Evans (1x2ml)  
 9. Laminuelas (20 unidades)  
 10. Instrucciones para el uso

**PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS**

**-LAMINAS CON CÉLULAS HEp-2 (1):** dejar en temperatura ambiente por 15 minutos antes de retirarlas del sobre. Estables en nevera (2-8°C) hasta la fecha de caducidad.

**-ANTIGAMAGLOBULINA HUMANA (IGG) MARCADA (2):** Lista para el uso Estable en nevera (2-8°C), hasta la fecha de caducidad. Proteger de la luz.

**-TAPÓN FOSFATO SALINO (3):** diluir el PBS concentrado con agua destilada e/o deionizada: 1 parte do PBS + 19 partes de agua destilada/deionizada. Conservar en nevera en un recipiente limpio y cerrado. Es estable por 1 mes. Descartar si ocurre turbación. El PBS diluido es usado como tapón de aclaración diluyente de las muestra del paciente.  
**-GLICERINA TAPONADA (4):** lista para el uso. Estable en nevera (2-8°C) hasta la fecha de caducidad.

No conservar en temperaturas inferiores a 2°C para evitar cristalización. Contiene azida sódica 0,95%.

**-SUERO CONTROL POSITIVO HOMOGÉNEO (5):** listo para el uso. Mantener en nevera (2-8°C) hasta la fecha de caducidad. Estable en nevera (2-8°C) hasta la fecha de caducidad.

**-SUERO CONTROL POSITIVO CENTROMÉRICO (6):** listo para el uso. Mantener en nevera (2-8°C). Contiene azida sódica 0,095%. Estable hasta la fecha de caducidad.

**-SUERO CONTROL NEGATIVO (7):** Listo para el uso. Mantener en nevera (2-8°C). Contiene azida sódica 0,095%. Estable hasta la fecha de caducidad.

**AZUL DE EVANS (8):** Listo para el uso. Conservar en nevera (2-8°C). Estable hasta la fecha de caducidad.

**Obs.:** El kit mantiene el mismo desempeño del primer uso, y es estable hasta la fecha de caducidad desde que sea mantenido en ea temperatura de 2-8°C.

**MUESTRA**

Solamente utilizar muestra de suero. Las muestras con la contaminación bacteriana, hemolizadas o lipemicas deben ser despresadas. Los sueros pueden ser conservados en nevera (2-8°C) hasta 72 horas. Para un tiempo mayor, deben ser guardados en congelador a -20°C. Evitar repetidos congelamientos y descongelamientos.

**MATERIAL NECESARIO, PERO NO FORNECIDO**

-Microscopio de fluorescencia  
 -Pipetas suerológicas  
 -Jarra de Coplin o similar

-Tubos y rack  
 -Agua destilada o deionizada  
 -Frasco para 1 litro  
 -Cámara de incubación  
 -Papel absorbente

**PROCEDIMIENTO**

a. **Teste Cualitativo (screening):** para selección y eliminación de los sueros no reactivos.

1. Diluir el suero de cada paciente a 1/40 con tapón diluyente (3) (10ul de suero + 390ul de tapón PBS diluido).

2. Dejar las laminas atingieren la temperatura ambiente por 15 minutos antes de retirarlas del sobre. Removerlas sin tocar en el sustrato, rotularlas y colocarlas en cámara húmeda.

3. Pingar 1 gota (50ul) de los controles positivo homogéneo(5), positivo centromérico (6) y negativo (7), sin diluir, en áreas 1 e 2 e 3 de las laminas, respectivamente. Evitar transbordar el área.

4. Pingar 1 gota de sueros desconocidos diluidos 1/40 en áreas restantes evitando transbordar.

5. Incubar en cámara húmeda por 30 minutos, en temperatura ambiente.

6. Remover las laminas de la cámara húmeda. Aguantarlas por una extremidad y lavarlas con tapón fosfato salino (PBS) (3), aproximadamente 10ml. Usando una pipeta dirigir el PBS por la borda longitudinal de las laminas, teniendo el cuidado de no atingir directamente los reactivos, evitando con eso perjudicar el sustrato. Colocar las laminas en una jarra de Coplin o similar y lavar 2 veces con PBS diluido (3) por 5 minutos cada vez, agitando suavemente el Coplin algunas veces.

7. Remover las laminas del Coplin, una de cada vez. Sacar el exceso de PBS sacudiendo la sobre papel absorbente. Secar en torno de áreas reactivas y ir inmediatamente para la etapa 8 para no secar el local de la reacción. El SECAJE DE LOS SUBSTRATOS AFECTARÁ SERIAMENTE LOS RESULTADOS.

8. Retornar a la cámara húmeda. Pingar 1 gota de la antimaglobulina marcada (2) en cada 8 área de las laminas, teniendo cuidado de recubrir las totalmente.

9. Incubar las laminas por 30 minutos en cámara húmeda, en temperatura ambiente, protegiendo del exceso de luz.

10. Remover las laminas de la cámara húmeda y sumergir en una jarra de Coplin o similar conteniendo PBS, para remover el exceso del conjugado. Transferirlas laminas para otra jarra de Coplin o similar con PBS diluido y lavar 2 veces, por 5 minutos cada vez, agitando suavemente el Coplin algunas veces. Pingar 2 a 3 gotas de azul de Evans(8) en el Coplin de esta última aclaración.

11. Remover las laminas del Coplin, una de cada vez. Tirar el exceso de PBS sacudiendo las sobre papel absorbente. Secar en torno de áreas reactivas y ir inmediatamente para la etapa 12 para no secar el local de la reacción.

12. Pingar 3 a 4 gotas de glicerina taponada (4) entre áreas reactivas. Cubrir las laminas con una laminela evitando la formación de burbujas. Secar el exceso de la glicerina con papel absorbente. Limpiar el dorso de las laminas.

13. Leer in microscop de fluorescencia. Es conveniente hacer la lectura en el mismo día. Pero en el caso de no ser posible, conservarlas en nevera (2-8°C) protegida de la luz en el oscuro por 1 semana, sin pérdida significantes de la fluorescencia.

b. **Teste Semi-Cuantitativo (Titulación):** para determinar el título del anticuerpo de los sueros positivos en el teste Cualitativo (screening).

1. Diluir los sueros positivos con tapón PBS diluido(3), obedeciendo la razón 2. Ejemplo: 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, ... 1/2560 o mas.

2. Dejar las laminas atingieren la temperatura ambiente por 15 minutos antes de retirarlas de sobre. Removerlas sin tocar en el sustrato, rotularlas y colocarlas en cámara húmeda.

3. Pingar 1 gota del control positivo homogéneo (5), positivo centromérico (6) y negativo(7), sin diluir, en áreas 1, 2 e 3 de las laminas, respectivamente. Evitar transbordar en el área.

4. Pingar 1 gota de los sueros diluidos de los pacientes en las áreas restantes usando una área para cada dilución. Evitar transbordar las áreas.

5. Seguir las etapas 5 a 13 del teste de selección (screening).

**RESULTADO DE LAS LECTURAS**

Reacción Negativa: AUSENCIA de fluorescencia verde-manzana característica. El imagen nuclear de las muestras deben ser siempre igual al control negativo.

Reacción Positiva: PRESENCIA de fluorescencia verde-manzana característica. El imagen nuclear e/o citoplasmática de la muestra es de fluorescencia mayor que el control negativo.

**INTERPRETACIÓN**

1. Patrón Homogéneo: es una sólida coloración de todo y núcleo en interfase, con ocasionales núcleos negativos. La región cromosómica de las células en metafase es positiva. Los antígenos nucleares en orden decreciente de frecuencia son: DPN, histona, DNA de duplas/simples-cinta (dsDNA/ssDNA)  
 Interpretación: Títulos altos son sugestivos de LES idiopatico es un teste mas específico y cuantitativo para anti-DNA debe ser realizado. Títulos mas bajos ocurren, ocasionalmente, en artritis reumatoide y en LES idiopático e inducido por drogas.

2. Patrón Periférico: es una sólida coloración en torno de la membrana nuclear, con débil coloración en el centro del núcleo, en interfase. La región cromosómica de las células mitóticas es positiva, como en el patrón homogéneo. Los antígenos son principalmente DNA de duplas/simples-cinta (dsDNA/ssDNA)

Interpretación: Títulos altos son sugestivos de LES idiopatico, debiendo ser realizadas determinación específicas e cuantitativas de anti-DNA. Títulos bajos sugieren otras enfermedad del tejido conjuntivo.

3. Patrón Puntillado: observase una coloración fina o granulosa de tamaño uniforme o variable en el núcleo en interfase, generalmente sin coloración concomitante del nucleólo. Los cromosomas son frecuentemente, negativos, pero la región fuera da área cromosómica corase de modo variable, dependiendo de los antígenos. Los antígenos nucleares para ese patrón incluyen Sm, RNP, Scl-70, SS-B/la e SS-A/Ro y muchos otros antígenos y anticuerpos.

Interpretación: presencia de Sm sugiere LES, RNP puede estar presente en enfermedad mixta del tejido conjuntivo, miositis, esclerodermia o LES, Scl-70, en la esclerodermia, SS-B/la y SS-A/Ro, en la síndrome de Sjogren, aun que el SS-A/Ro pueda dar patrones diferentes de coloración.

4. Patrón Nucleolar: observase gránulos espesos dentro del núcleo, generalmente menos que 6 por célula, y con o ocasionales finas granulaciones. La región cromosómica de la células mitóticas es negativa. Antígenos nucleolares pueden presentar diferentes relaciones de locales con el ciclo celular. Los antígenos son Pm-Scl, nucleolin, Ku o otros desconocidos. Interpretación: títulos altos son sugestivos de LES idiopatico, debiendo ser realizadas determinación específicas e cuantitativas de anti-DNA. Títulos bajos sugieren otras enfermedad del tejido conjuntivo.

5. Patrón Centromérico: es el único que puede ser fideelmente definido. Observase en el una coloración ligeramente granular, generalmente múltiplo de 46, muy discreta. En la HEp-2 ocurre coloración característica de las células mitóticas en la área cromosómica en el núcleo interfase.

Interpretación: el anticuerpo anti-centrómero es altamente sugestivo de una variante de esclerodermia llamada CREST (calcinosis, fenómeno de Reynaud, dismilitidad esofágica, esclerodermia y telangiectasia)

6. Patrón Mitocndrial: groseros gránulos irregulares, extendiéndose en forma de filamentos del núcleo para todo el citoplasma. El antígeno inocular es el M2.

Interpretación: este patrón es común en la cirrosis biliar primaria y muy raro en enfermedades del tejido conjuntivo.

**LIMITACIONES DEL MÉTODO**

En algunos casos, sueros positivos para fluorescencia nuclear, tanto pueden ser débil-reativos o negativos en la dilución inicial (fenómeno prozona). En tales casos dudosos, el suero debe ser triado las diluciones mas altas, y, si positivo, los títulos de anticuerpos deben ser determinados.

Un alto título de ANA sugiere enfermedad del tejido conjuntivo. Pero, ni todo ANA alto puede ser considerado diagnóstico. Los resultados de tests deberán ser analizados junto con otros resultados suerológicos, como también, con el examen clínico del paciente.

Este fenómeno puede presentar dos o mas tipos de padrones de fluorescencia. Este fenómeno mismo ser observado cuando la muestra es titulada até su punto final. La incidencia de ANA positivo aumenta con la edad del paciente, tal como puede ocurrir en una pequeña proporción de pacientes con enfermedades infecciosas e/o neoplásicas.

Combinaciones de Auto-anticuerpos pueden inducir a padrones homogéneos e/o puntillados y, por lo tanto es, recomendado que testes específicos para dsDNA y ENA (antígenos nucleares extraíbles) sean realizados en todas las muestras con patrón homogéneo.

La fuente de luz, filtros y la óptica de las diferentes marcas de microscopios de fluorescencia influenciaron a la sensibilidad del teste.

**PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS**

1. Reactivos solamente para uso de diagnostico in vitro  
 2. Las laminas deben ser conservadas en congelador a -20°C evitando el congelamiento y descongelamiento el restante del kit deberá ser conservado en nevera entre 2-8°C

3. La conservación de la lamina puede ser hecha sellando las bordas de laminuelas con esmalte de uñas y guardando las en el oscuro entre 2-8°C por en el máximo 2 meses.

4. Como se emplea azida a 0,095% como conservante el descarte de los reactivos deben ser acompañados de grandes volúmenes de agua para evitar el acumulo de azida en las tuberías pues esa puede reaccionar con el plomo y formar compuestos sales altamente explosivos Además la azida sodica es toxica cuando ingendera.

5. Todos los materiales humanos usados en la preparación de los controles fueron testados con resultados negativos para el anticuerpo anti VIH anti HCV y anfigenos de superficie de hepatitis B (HBsAg) pero como ningún método diagnostico ofrece completa seguridad de la ausencia de estas y otros agentes infecciosos recomienda se tratar los sueros controles como materiales potencialmente infecciosos.

6. No sustituir componentes de eses kit con los de otros fabricantes ni usar componentes de lotes y códigos distintos

7. No usar fuera de la fecha de caducidad

8. Descarte de lo material de acuerdo con las regulaciones locales.

9. Realizar un mantenimiento regular del microscopio, ya que la extrapolación de la vida de la lámpara podrían afectar el análisis de los resultados.

10. Seguir las buenas practicas de laboratorio (BPL) en la conservación manoseo y descarte e los materiales.

**TÉRMINO DE GARANTÍA**

La WAMA Diagnostica garantiza el cambio de este conjunto diagnostico si desde el momento que el mismo está dentro el plazo de caducidad y sea comprobado por su accesoria técnica de que no hubieron fallos en la ejecución, manoseo y conservación de este producto. La WAMA y sus distribuidores no se responsabilizan por los fallos en el desempeño del kit bajo sobre estas condiciones.

## BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFÍA

- Ben-Chetrit, E.: The molecular basis of the SS-A/Ro antigens and the clinical significance of their autoantibodies. *Br. J. Rheum.* 32: 396-402, 1993.
- Fritzer, M. J.; Kinsella, T. D. and Garbutt, E.: The CREST syndrome: A distinct serologic entity with anti-centromere antibodies. *Am. J. Med.* 69: 520, 1980.
- Humbel, R. L.: Detection of antinuclear antibodies by immunofluorescence. In: Van Venrooij, W. J. ; Maini, R. N. (editor): **Manual of Biological Markers of Disease.** Kluwer Academic Publisher, A21, A21/6, 1993.
- Molden, D. R.; Nakamura, R. M. and Tan, E. M.: Standardization of immunofluorescence test for autoantibody to nuclear antigens (ANA). Use of reference sera of defined antibody specificity. *Am. J. Clin. Pathol.*, 87: 57, 1984.
- Naparstek, Y.: The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Ann. Rev. Immunol.*, 11: 79, 1993.
- Tan, E. M.; Cohen, A. S.; Fries, J. F.; et al.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 25(11), 1271-77, 1982.
- Tan, E. M.: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA). Their immunobiology and medicine. *Adv. Immunol.*, 33: 167-239, 1982.
- Tan, E. M.: Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune for diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.*, 40: 93-151, 1989.
- Van Venrooij, W. J.; et al.: The consensus workshops for the detection os autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. *J. Imm. Meth.*, 140: 181-189, 1991.
- Van Muihlen, C. A. and Tan, E. M.: Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Sem. Arthr. Rheum.*, 24(5): 323-358, 1995.

### SIMBOLOGIA / SIMBOLS / SIMBOLOGIA

	O conteúdo é suficiente para ( n ) testes Quantity sufficient for (n) tests O contenido es suficiente para ( n ) testes		Número do lote Lot Number Número del lote
	Data limite de utilização Expiry Date Fecha de la caducidad		Número do catálogo Catalog Number Número del catálogo
	Produto diagnóstico in vitro In vitro diagnostic Producto diagnóstico in vitro		Limite de temperatura Temperature Limite de temperatura
	Consultar instruções para uso Refer to user's instructions Consultar las instrucciones para el uso		Proteger do calor Keep away from sunlight Proteger del calor
	Representante Europeu European Representative Representante Europeu		Fabricado por Manufactured by Fabricado por

VI Edição: Rev. 04/2010