

La preparazione dei vetrini in immunofluorescenza indiretta: valutazione di un sistema automatico

Ignazio Brusca, Piero Li Vigni, Rosa Sucato, Stella Maria La Chiusa

Servizio di Patologia Clinica, Ospedale "Buccheri La Ferla" Fatebenefratelli, Palermo

ABSTRACT

Evaluation of the hyperion hy prep system plus, an automated system to perform the indirect immunofluorescence methods

The indirect immunofluorescence (IFI) is a laboratory method for autoantibodies detection in use for several years. There are standardization problems in the reagent's nature, in the procedure and in the interpretation of the results. The aim of this study is a complete evaluation of an automated system to perform IFI method. We have compared HEP II slides performed in manual and by Hy Prep System Plus and we have verified no differences in ANA titers of examined sera. The precision of the instruments has been good and no carry over has been found. The microscopic cell fluorescence in slides automatically processed has been slightly worse, but it has not hampered the interpretation of cellular wells.

RIASSUNTO

L'Immunofluorescenza indiretta (IFI) è una metodica utilizzata da numerosi anni nella diagnostica, in particolare nella ricerca ed identificazione degli autoanticorpi. Presenta difficoltà di standardizzazione dovuti alla natura e composizione dei reagenti, alla esecuzione della metodica ed alla fase interpretativa dei preparati. Nel presente lavoro abbiamo valutato gli aspetti operativi e la qualità dei risultati ottenibili con un sistema automatico per la preparazione dei vetrini. Nel confronto tra i vetrini processati a mano e quelli processati automaticamente nessuna differenza è stata evidenziata nei titoli ANA dei sieri esaminati. Non abbiamo riscontrato carry over e la precisione è stata buona. Abbiamo osservato un leggero decadimento del quadro fluoroscopico, senza che questo pregiudicasse in maniera significativa le valutazioni sui pozzetti esaminati.

INTRODUZIONE

L'Immunofluorescenza indiretta (IFI) è una metodica di laboratorio utilizzata da numerosi anni ed in diversi campi nella diagnostica, in particolare nella infettivologia e nella ricerca ed identificazione degli autoanticorpi (1). Col metodo IFI viene evidenziata la reazione antigene-anticorpo "in situ" su fettine di tessuto o su strati di colture cellulari. Nel campo dell'autoimmunità l'IFI è sicuramente la tecnica più utilizzata. Essa permette di rilevare un cospicuo numero di autoanticorpi, con buona sensibilità, costo relativamente contenuto e facilità di esecuzione. Variando il tessuto o la coltura cellulare è possibile identificare contemporaneamente vari autoanticorpi, e di effettuare, tra loro, una differenziazione significativa da punto di vista diagnostico con l'evidenziazione di uno specifico "pattern" di fluorescenza (2). Uno dei limiti più importanti di questo metodo è dato dalle difficoltà di standardizzazione dovuti alla natura e composizione dei reagenti (tessuto utilizzato e metodo di fissazione, tampone di diluizione del siero, natura dell'anticorpo coniugato), alla modalità di esecuzione della metodica ed alla fase interpretativa dei preparati (3-4). Recentemente sono stati messi a punto

dei sistemi robotizzati in grado di eseguire in maniera automatica la metodica, con il duplice vantaggio di diminuire il carico di lavoro manuale del laboratorio e standardizzare l'esecuzione, incidendo pertanto su uno delle cause di variabilità nel metodo. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare uno di questi sistemi automatici sia nei principali aspetti operativi, sia soprattutto nella qualità dei risultati ottenibili.

MATERIALI E METODI

Il preparatore automatico di vetrini preso in esame è stato l'HYPERION HY PREP SYSTEM PLUS (Alifax Padova). Nella configurazione da noi utilizzata il sistema è in grado di effettuare diluizioni seriali da 1:10 ad 1:1280 dei sieri di 12 pazienti, e di utilizzare in maniera random queste diluizioni con 4 substrati diversi per un totale di 90 pozzetti. In alternativa è possibile effettuare una sola diluizione da utilizzare come screening su 92 sieri. E' in grado di processare contemporaneamente 4 vetrini di HEP II da 10 pozzetti, 2 vetrini di Crithidia Lucilia da 10 pozzetti, 3 vetrini con stomaco-rene-fegato di ratto da 8 pozzetti, 1 vetrino con neutrofili fissati da 6 pozzetti.

In una prima fase i sieri vengono posti su un porta campioni e le diluizioni effettuate in provettine monouso in plastica poste sulla destra dello strumento. Effettuate le diluizioni si sostituisce il piatto portacampioni con un piatto porta vetrini con cui prosegue in completo automatismo il resto della seduta. Unica operazione manuale finale la deposizione del medium di montaggio e del vetrino coprioggetto. Nella configurazione da noi utilizzata il preparatore dispensa 45 µl di campione per i vetrini di HEP II, 37 µl per i vetrini con *Crithidia Luciliae*, 70 µl per i vetrini con stomaco-rene-fegato di ratto, 36 µl per i vetrini con substrato di Neutrofili; effettua ad ogni passaggio della metodica 9 cicli di lavaggio con 47 µl di PBS; la quantità di coniugato dispensata per pozzetto è di 40 µl.

Abbiamo effettuato prove sui tempi di esecuzione dei singoli processi, cioè diluizione e dispensazione/lavaggio dei pozzetti. Per quanto riguarda l'aspetto qualitativo abbiamo valutato in contemporanea su vetrini di cellule HEP II (Alphadia, Wawre Belgium) il titolo di 8 sieri processati contemporaneamente sul preparatore ed in manuale. La metodica manuale prevedeva: la dispensazione dei sieri diluiti; una incubazione di 30 min in camera umida a temperatura ambiente; un lavaggio PBS di 10 min con soluzione sostituita dopo 5 min; la dispensazione del coniugato; 30 min di incubazione nelle stesse condizioni precedenti; un lavaggio di 5 min in PBS; + Blue di Evans, un lavaggio di 5 min in PBS, aggiunta del medium di montaggio.

Per quanto riguarda il carry over abbiamo utilizzato due campioni: un siero con titolo ANA di 1:2560 e pattern omogeneo facendolo diluire per tre volte di seguito con diluizioni seriali, successivamente seguito dalle diluizioni di una soluzione di PBS +BSA al 7%; poi un siero con specificità anti Mitocondrio e titolo 1:1280 diluito sempre tre volte consecutive e seguito di nuovo da PBS +BSA al 7%. Abbiamo quindi saggiato sui vetrini delle cellule HEP II le diluizioni della soluzione PBS +BSA a partire da 1:10. Per quanto riguarda la precisione, tre sieri con titoli ANA rispettivamente di 1:80, 1:320, 1:1280, (titoli ottenuti manualmente), sono stati processati 10 volte ciascuno con diluizione seriali e sono stati dispensati: la diluizione del titolo conosciuto, quella precedente e quella successiva. E' stata infine valutato l'aspetto fluoroscopico dei preparati su sieri con tre pattern diversi: omogeneo, "fine speckled" ed anti centromero. Ogni vetrino è stato letto indipendentemente da tre operatori diversi.

Tabella 1

Tempi misurati nella diluizione di 12 sieri con il preparatore di vetrini Hy Prep System Plus

Tempo in minuti		
Diluizione singola 1:80	Diluizioni seriali da 1:10 ad 1:80	Diluizioni seriali da 1:10 ad 1:1280
8.4	22	37

RISULTATI

Nella tabella 1 sono indicati i tempi misurati nella diluizione di 12 sieri, nella tabella 2 i tempi per la processazione dei vetrini. Nel confronto tra i vetrini processati a mano ed i vetrini processati dall'apparecchio nessuna differenza è stata evidenziata nei titoli ottenuti con gli 8 sieri presi in esame. Non ci sono state discordanze tra i tre esaminatori. Le diluizioni 1:10 della PBS +BSA al 7%, sia quella che segue le diluizioni del siero ANA positivo sia quella che segue le diluizioni del siero AMA positivo, sono completamente negative, così come le altre diluizioni. Per quanto riguarda la precisione non ci sono state differenze apprezzabili di titolo nelle 10 ripetizioni dei tre sieri con ANA a titolo diverso. Nell'aspetto fluoroscopico una lieve ma percettibile differenza è stata evidenziata tra i vetrini processati manualmente e quelli processati automaticamente. In questi ultimi lo strato delle cellule appare meno compatto, soprattutto alla periferia del pozzetto, e leggermente frammentato. La nitidezza del quadro fluoroscopico appare leggermente inferiore senza per questo impedire una corretta lettura del preparato. Non si nota fluorescenza aspecifica, indice di una corretta ed efficace procedura dei lavaggi. La fluorescenza è distribuita omogeneamente fino ai due terzi del pozzetto. Ai bordi, infatti, a volte è possibile evidenziare una certa disomogeneità. Proseguendo nel confronto non si notano differenze di aspetto apprezzabili nei pattern granulare fine ad anti-centromero. Il pattern omogeneo, invece, presenta una accentuazione periferica della fluorescenza nei vetrini processati automaticamente rispetto a quelli ottenuti manualmente.

DISCUSSIONE

I dati delle valutazioni temporali ci evidenziano che fino a 2 vetrini vi è poca differenza nei tempi di preparazione tra manuale e col preparatore automatico. Dal terzo vetrino in poi il preparatore impiega più tempo. Se si allungano i tempi di esecuzione delle metodiche, è però da considerare che queste avvengono in completo automatismo. Nell'esame della metodologia più corretta per la valutazione qualitativa dello strumento ci siamo immediatamente resi conti di un problema importante: la fase finale di produzione del risultato non era affidata ad un rivelatore oggettivo, in grado di fornire valori numerici atti ad essere elaborati statisticamente, bensì ad un elemento soggettivo quale l'occhio umano. I dati ottenuti non erano valori

Tabella 2

Tempi misurati nella processazione di vetrini di cellule HEP II

Tempo in minuti		
1 vetrino (10 pozzetti)	2 vetrini (20 pozzetti)	3 vetrini (30 pozzetti)
70	92	122

numerici rappresentanti una variabile continua ben definiti, valutazioni semiquantitative discontinue. Tenendo conto di questi limiti abbiamo cercato una procedura che fosse quanto più possibile aderente alle indicazioni della letteratura scientifica (5-7) e potesse fornire dati quanto più possibile obiettivi. I risultati ottenuti ci permettono di affermare che il sistema Hy Tech System Plus, su cellule HEP II, consente di ottenere valutazioni semiquantitative identiche a quelle ottenute con procedimento manuale. Il carry over non è apprezzabile. Non sono riscontrabili inoltre differenze che possono inficiare la precisione dei test. Per quanto riguarda il quadro fluoroscopico, rispetto ai vetrini processati manualmente si nota un certo decadimento qualitativo, ma questo non pregiudica la leggibilità del preparato. Le alterazioni dello strato di cellule sono principalmente evidenti ai bordi del pozzetto, e sono probabilmente dovute agli effetti meccanici nella preparazione dei vetrini, probabilmente durante i lavaggi. I pattern fluoroscopici saggiati non presentano alterazioni significative del loro aspetto, indice di una conservazione delle caratteristiche antigeniche del preparato.

CONCLUSIONI

Le odierne esigenze dei laboratori di coniugare economicità di esercizio, alta standardizzazione, incremento qualitativo e quantitativo dei test, diminuzione dei tempi di consegna dei risultati, ha spinto le industrie a progettare e produrre dei sistemi flessibili veloci e completamente automatici. L'ampio pannello di analiti disponibili su questi sistemi, nei vari campi della diagnostica di laboratorio, ha

reso esiguo il numero di metodiche eseguite manualmente. L'immunofluorescenza indiretta, in gran parte dei laboratori in cui viene eseguita, rimane nel numero delle metodiche manuali. La disponibilità di questo sistema di preparazione dei vetrini, viene incontro pertanto alle odierne esigenze di laboratorio e rende l'IFI di più semplice esecuzione e maggiormente standardizzabile rispetto al passato.

BIBLIOGRAFIA

1. Rothfield N. F. Detection of antibodies to nuclear antigens by immunofluorescence. In Rose N.R. Friedman H., Manual of clinical immunology, Washington D.C., American Society for Microbiology, 1976: 647-56.
2. Tan E.M. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA); their immunobiology and medicine. *Advances in Immunology*, 1982; 33: 167-241.
3. Mc Carty G.A., Valncia D.W. Fritzler M.J. Antinuclear antibodies. Contemporary techniques and clinical applications to connective tissue diseases. New York, Oxford:Oxford University Press, 1984.
4. Harmon C.E., Deng J.S., Peebles C.L., Tan E.M., The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 166-76.
5. Haeckel R. Evaluation methods in laboratory medicine. Weinheim, Germany VCH, 1993: 314.
6. Fraser CG, Singer R. Better laboratory evaluations of instruments and kits are required. *Clin Chem* 1985; 31: 667-70.
7. Fraser CG, Hyltoft Petersen P. Desirable standards for laboratory tests if they are to fulfil medical needs. *Clin Chem* 1993; 39: 1447-55.