

HEp-2000[®] COLORZYME[®] ANA-Ro TESTSYSTEM

För diagnostisk användning in vitro
För yrkesmässigt bruk

AVSEDD ANVÄNDNING: Detta är ett indirekt enzymantikropptest för halvkvantitativ detektion av antinukleär antikropp i humanserum. Detta testsystem använder transfekterade[†] HEp-2 celler, som gör det möjligt att specifikt identifiera autoantikroppar mot SSA/Ro-antigen. Autoantikroppar mot SSA/Ro kan uppvisa ett distinkt färgningsmönster på de transfekterade cellerna. När ett sådant mönster föreligger betraktas det som ett bevis på att det finns anti-SSA/Ro-antikroppar.

Att ett sådant distinkt mönster saknas utesluter inte att det finns anti-SSA/Ro-antikroppar.

Detta testsystem skall användas som ett hjälpmedel vid detektion av antikroppar som är associerade med systemisk reumatisk sjukdom.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET

Antinukleär antikropp (ANA) är en allmän term som används för att beskriva autoantikroppar mot olika cellnukleära proteiner. Tidiga studier av sådana autoantikroppar med immunofluorescerande teknik påvisar ett litet antal nukleärproteinspecificiteter (1). På grund av det höga sambandet mellan positiv ANA och systemisk lupus erythematosus (SLE) utesluter negativ ANA i huvudsak sjukdomen (2).

Även om DNA-specifika antikroppar fortfarande har ett högt sjukdomssamband med SLE (3), har även ett antal nukleära (4) och cytoplasmiska (5-7) makromolekyler upptäckts och associerats med andra bindvävssjukdomar (8-10). Vissa av dessa antikroppar verkar ha diagnostisk och/eller prognostisk betydelse vid progressiv systemisk skleros (11-12), blandad bindvävssjukdom (13-15) Sjögrens syndrom (16-17), polymyosit (18) och/eller reumatoid artrit (19). På grund av dessa sjukdomsassociationer har ANA-analys nu etablerats som ett allmänt screeningredskap för bindvävssjukdom (20).

ANA-testkänsligheten varierar beroende på vilken typ av substrat och vilka fixativmetoder som används samt vilka ANA-typer som finns i sera. Cellkultursubstrat uppvisar i allmänhet större känslighet än vävnadssektioner (21-24). Detektionen av autoantikroppar mot SSA/Ro-antigenen varierar i högsta grad. Gnararvävnad uppvisar inga påvisbara nivåer av SSA/Ro-antigen (25), och rapporter om detektion av anti-SSA/Ro-antikroppar i cellkultursubstrat varierar i känslighet mellan 50 och 90 procent (26-27).

Immuno Concepts HEp-2000[®] Colorzyme[®] ANA-Ro-testsystem med transfekterade mitotiska* humanepiteloidceller (HEp-2) är ett avancerat immunenzymssystem för detektion av ANA. HEp-2-celler med mitotiska former har visats sig ha större känslighet och ge skarpare mönsterigenkänning än klassiskt musnjuresubstrat för detektion av antikroppar vid progressiv systemisk skleros (PSS) (28). Mitotiska former bidrar till urskiljandet av olika mönster och detektion av tidigare orapporterade nukleära antigener som förekommer i högre koncentrationer i mitotiskt aktiva celler (29-31). HEp-2-cellerna i detta testsystem har transfekterats med flera kopior av den specifika DNA-sekvens som bär informationen för SSA/Ro-autoantigenen. Cirka 10-20% av de transfekterade cellerna överexpresserar denna antigen så att detektionen av autoantikroppar mot SSA/Ro är mer jämn än för HEp2-celler som inte har transfekterats.

[†]De transfekterade cellerna och deras användning är skyddade genom USA-patent 5518881

*Mitos är en term som används för att beskriva celledelningsprocessen. Den indelas vanligtvis i sex faser: interfasa, profasa, metafasa, anafasa, telofasa och cytokines.

Autoantikroppar mot SSA/Ro kan uppvisa ett distinkt färgningsmönster på de transfekterade cellerna. När ett sådant mönster föreligger betraktas detta som ett bekräftande bevis på att det förekommer anti-SSA/Ro-antikroppar.

Att ett sådant distinkt mönster saknas utesluter inte att det finns anti-SSA/Ro-antikroppar.

TESTPRINCIP

Immuno Concepts HEp-2000[®] Colorzyme[®] ANA-Ro testsystem använder sig av indirekt enzymantikroppmetod. Spädda patientprover odlas med antigensubstrat för att tillåta specifik bindning av autoantikroppar till cellkärnorna. Om det förekommer ANA bildas ett stabilt antigen/antikroppkomplex. Efter tvättning för att avlägsna obundna antikroppar odlas substratet med en antihuman antikropp konjugerad med pepparrotsperoxidas (HRP). Om resultatet är positivt bildas ett stabilt komplex i tre delar bestående av en HRP-konjugerad antihuman antikropp bunden till en human antinukleär antikropp, som i sin tur är bunden till en nukleär antigen. Detta komplex kan visualiseras genom att objektglaset odlas i Colorzyme[®] färgreagens innehållande ett enzymspecifikt substrat. Reaktionen mellan den enzymerkädda antikroppen och det enzymspecifika substratet leder till en färgreaktion som är synlig på objektglaset i standardljusmikroskop. I positiva prover får cellkärnorna en blålig färgning med ett färgningsmönster som är karaktäristiskt för den aktuella nukleära antigenfördelningen i cellerna. Om provet är ANA-negativt uppvisar cellkärnan inget klart urskiljningsbart mönster av nukleär färgning. Cytoplasman kan uppvisa en svag färgning, medan det icke-kromosoma området i de mitotiska cellerna kan uppvisa en mörkare färgning.

SYSTEMKOMPONENTER - MATERIAL SOM INGÅR

Användning: Alla komponenter levereras bruksfärdiga utan krav på delning eller rekonstitution (förutom PBS-bufferten och Colorzyme[®] färgreagensen som måste lösas upp i avjoniserat eller destillerat vatten före användning).

Förvaring: Alla komponenter kan kylförvaras i 2-10°C. Efter rekonstitution skall PBS- bufferten förvaras i skruvlockbehållare och lagras mellan 2-25°C.

Efter rekonstitution skall Colorzyme[®] färgreagens förvaras i en stängd behållare i rumstemperatur i upp till 30 dagar. Beroende på användningstakten kan 150 ml Colorzyme[®] färgreagens användas med maximalt tjugo objektglas.

Stabilitet: Alla komponenter är stabila i minst tolv månader från tillverkningsdatum. Använd ingen komponent efter dess utgångsdatum.

REAKTIVA REAGENSER

Objektglas för substrat **SLIDE**: ANA-objektglas för substrat med HEp-2000[®]-celler (med mitotiska former) som är odlade och stabiliserade direkt på testbrunnarna. Detta är HEp-2-celler som stabilt har transfekterats med SSA/Ro-antigenen. Ett unikt vallgravsformat objektglas minimerar korskontamination mellan brunnarna under analysen. Objektglaspåsen är fylld med en stabil giffri gas som bidrar till cellernas stabilitet.

SSA/Ro positiv kontroll **CONTROL|+**: Katalognr 2035-Ro. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml positivt humankontrollserum med antikropp specifik för SSA/Ro-antigener. Detta serum uppvisar en finfläckig färgningsreaktion som är typisk för anti-SSA/Ro, vilket Immuno Concepts HEp-2000[®] cellsubstrat är ett exempel på. Uttrycket är till övervägande grad nukleärt lokaliserat, med framträdande nukleolär färgning. Svag cytoplasmisk färgning kan även noteras i de överexpresserande cellerna. De mitotiska cellernas kromosomområde uppvisar en negativ färgreaktion.

Homogen positiv kontroll **CONTROL|+**: Katalognr 2021. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml positivt humankontrollserum med antikropp specifik för DNA och/eller DNP-nukleära antigener. Detta serum uppvisar en homogen färgningsreaktion på Immuno Concepts HEp-2000[®]-cellsubstrat. De mitotiska cellernas kromosomområde uppvisar samma homogena färgreaktion.

Fläckig positiv kontroll **CONTROL|+**: Katalognr 2022. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml positivt humankontrollserum med antikropp som är specifik för Sm och/eller RNP-nukleära antigener. Detta serum uppvisar en av de mest vanliga fläckiga färgreaktioner som noterats på Immuno Concepts HEp-2000[®]-cellsubstrat. De mitotiska cellernas kromosomområde uppvisar en negativ färgreaktion.

Nukleolär positiv kontroll **CONTROL|+**: Katalognr 2023. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml positivt humankontrollserum med antikropp som är specifik för nukleolära antigener. Detta serum uppvisar en nukleolär färgningsreaktion på Immuno Concepts HEp-2000[®]-cellsubstrat.

Centromer positiv kontroll [CONTROL] +: Katalognr 2025. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml positivt humankontrollserum med antikropp som är specifik för kromosomala centromerer (kinetochore). Detta serum uppvisar en åtskiljd fläckig färgningsreaktion på Immuno Concepts HEp-2000[®]-cellsubstrat. De mitotiska cellernas kromosomområde uppvisar samma åtskiljda fläckiga färgningsreaktion.

Titrerbart kontrollserum [TC]: Katalognr 2026. Bruksfärdig ampull innehållande 0,5 ml positivt humankontrollserum som skall behandlas som ett outspätt patientprov.

Negativt kontrollserum [CONTROL] -: Katalognr 2031. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml negativt humankontrollserum. Även om det negativa kontrollserumet kan uppvisa en svag färgning av cytoplasma med en ljusare färgning av den mitotiska cellens icke-kromosomområde, uppvisar det ingen urskiljningsbar nukleär färgning.

Enzymantikroppreagens [CONJ|HRP]: Katalognr 4009-Ro (9,0 ml), 4075-Ro (23 ml). Antihuman IgG konjugerade med pepparrotsperoxid (HRP). Reagensen levereras bruksfärdig i precisionspipettflaskor med 9,0 ml för vart tionde objektglas i kompletta testsatser.

Färgreagens [PWDR|CRP]: Katalog nr 4066. HRP-specifikt enzymsubstratpulver innehållande 4-kloro-1-naftol. Varje förpackning innehåller pulver för framställning av 150 ml självaktiverande Colorzyme[®] färgreagens.

Framställning: Lös upp innehållet i en påse i 150 ml avjoniserat eller destillerat vatten. Blanda väl tills preparatet har lösts upp helt och hållet. Denna färgreagens är stabil i 30 dagar i rumstemperatur i försluten behållare. Färgreagensen kan återanvändas under högst 30 dagar, eller tills det syns någon färgförändring eller fällning. Grumling eller opalescens utan synlig fällning vid återanvändning är normalt. Beroende på användningstakten kan 150 ml Colorzyme[®] färgreagens användas med maximalt tjugo objektglas.

ICKE-REAKTIVA KOMPONENTER

PBS buffertpulver [PWDR|PBS]: Katalognr 1011. Fosfatbuffrat saltlösningpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0.2). Varje påse innehåller tillräckligt med buffertpulver för att ge 1 liter. (En påse med buffertpulver levereras för vart femte objektglas i kompletta testsatser).

Preparering: Lös upp en påse buffertpulver i 1 liter avjoniserat eller destillerat vatten, täck och lagra mellan 2-25° C i upp till fyra veckor, eller tills det syns tecken på kontamination eller andra synliga förändringar.

Halvpermanent monteringsmedel [SOLN|MM]: Katalognr 1111. Bruksfärdig pipettampull innehållande 5,0 ml glycerolbaserat monteringsmedel.

Skyddsremсор [CVSLP]: Katalog nr 1042. Varje bunt innehåller tio 24 x 64 mm skyddsremсор nr 1 av glas.

YTTERLIGARE MATERIAL SOM BEHÖVS - MEDFÖLJER EJ

Volymetriska pipetter för pipettering av 20-25 µl volymer
Tre Coplin-kärl eller färgningsskålar
Klämflaska eller Pasteur-pipetter
Serologiska pipetter
Enliters skruvlockbehållare (för PBS-buffert)
Stängda behållare för att förvara Colorzyme[®] färgreagens
Avjoniserat eller destillerat vatten
Provrör för att framställa serumspädningar
Inkubationskammare
Läskapper eller pappershanddukar
Engångshandskar
Laboratorietidur
Ljusbmikroskop (standardutförande) med kapacitet för 200 och 400 gångers förstoring

FÖRSIKTIGHET

1. Allt material av humant ursprung som använts i denna produkt har testats med FDA-godkända metoder och visat sig vara negativt (inte upprepat reaktivt) för antikroppar mot humant immunbristvirus-1 (HIV-1), humant immunbristvirus-2 (HIV-2), hepatit C-virus (HCV) och hepatit B-ytantigen (HBsAg). Ingen testmetod kan emellertid helt garantera att det inte förekommer något HIV-1, HIV-2, hepatit C, hepatit B eller andra smittämnen. Därför skall allt satsmaterial hanteras som potentiellt smittsamt.

2. Alla patientprover på biosäkerhetsnivå 2 skall hanteras enligt rekommendationerna för eventuellt smittsamt humanserum eller blodprov i manualen från Centrum för Sjukdomskontroll/Nationella hälsoinstitut: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Spädning av komponenter eller byte till andra komponenter än de som medföljer detta system kan ge motsägande resultat.
4. Natriumazid (0,09%) används som konserveringsmedel. Natriumazid kan reagera med bly- eller kopparrör och bilda explosiva metallazidsalter. När reagenser kasseras skall man spola med stora mängder kranvatten för att avlägsna eventuella rester i avloppssystemet. Natriumazid är ett gift och kan vara toxiskt vid förtäring.
5. Denna sats är avsedd för diagnostisk användning *in vitro*.
6. Om hemolyserat eller lipemiskt sera måste användas skall inaktivt sera värmas i 30 minuter i 56°C för optimala resultat. Mikrobiellt kontaminerat sera skall inte användas.
7. Det titrerbara kontrollserumet är avsett för övervakning av reproducerbarheten mellan olika loter eller serier. Det är inte avsett för mätning av den totala sensitiviteten eller analysens specificitet.
8. Undvik att röka, äta eller dricka i områden där prover eller satsreagenser hanteras.
9. Undvik alltid stänk eller alstring av aerosoler.
10. Andra inkubationstider och temperaturer än de angivna kan ge felaktiga resultat.
11. Korskontaminationer mellan reagenser och prover kan ge felaktiga resultat.
12. Återanvändningsbart glas måste tvättas och sköljas noggrant för att avlägsna rengöringsmedel före användning. Allt glas måste rengöras och torkas före användning.
13. Placera alla reagenser, objektglas och prover i rumstemperatur (18-25°C) före användning.
14. Använd engångshandskar vid hantering av prover och reagenser, och tvätta händerna noggrant efteråt.
15. Mikrobisk kontamination mellan reagenser eller prover kan ge felaktiga resultat.
16. Pipettera aldrig med munnen och undvik att komma i kontakt med reagenser och prov med hud eller slemhinnor. Tvätta med bakteriedödande tvål och rikligt med vatten om kontakt ändå skett.
17. Färgreagens kan återanvändas i högst 30 dagar, eller tills det syns någon färgförändring eller fällning. Grumling eller opalescens utan synlig fällning vid återanvändning är normalt. Beroende på användningstakten kan 150 ml Colorzyme® färgreagens användas med maximalt tjugo objektglas.

PROVTAGNING

Provtagning: Serum rekommenderas som prov. Cirka 5 ml helblod skall tas aseptiskt genom venpunktion med hjälp av ett sterilt vakuumbloodtagningrör eller annat lämpligt blodtagningssystem. Låt blodet koagulera i rumstemperatur (18-25°C). Serum skall så snart som möjligt separeras från koagler genom centrifugering för att minimera hemolys.

Störande ämnen: Sera som uppvisar en hög grad av hemolys, ikterus, lipemi, eller mikrobiell tillväxt bör inte användas, eftersom dessa betingelser kan leda till avvikande resultat. Prover som innehåller synliga partiklar bör klargöras genom centrifugering före analysen.

Förvaring: Sera kan förvaras i 2-10°C i högst en vecka. Om analysen fördröjs ytterligare skall sera frysas i -20°C eller lägre. Serum bör inte förvaras i självavfrostande kylskåp eller fryslagerrum.

WARNING: Upprepad frysning/upptining av patientprover kan ge felaktigt positiva eller negativa resultat.

TOLKNING AV RESULTAT

KVALITETSKONTROLL

Positiva, negativa och PBS-kontroller skall testas en gång per körning. Den positiva kontrollen bör uppvisa mörkblå/lila färgning i cellkärnorna, med ett klart urskiljningsbart mönster som är karaktäristiskt för det kontrollserum som använts. Cytoplasman kan få ljusblå/lila färg i den positiva kontrollbrunnen. Den negativa kontrollen skall uppvisa ljusblå/lila färgning av både cytoplasman och kärnan, men utan ett urskiljningsbart nukleärt färgningsmönster. PBS-kontrollen används för att observera ospecifik färgning av enzymantikroppreagensen och skall inte uppvisa blå färgning. Om kontrollerna inte ser ut enligt beskrivningarna är testet ogiltigt och bör göras om. Om HEp-2000® ANA-Ro-test skall användas för att bekräfta förekomsten av anti- SSA/Ro-antikroppar måste SSA/Ro positiv kontroll, katalognummer 2035-Ro, köras på minst ett objektglas under den dagens körning.

TILLHÖRANDE TITRERBAR KONTROLL

Vid avläsning av antikroppnivåerna börjar många laboratorier med att läsa den brunn som innehåller det mest spädda provet och läser "baklänges" till spädningen 1:40. Den första brunnen med ett klart urskiljningsbart nukleärt färgningsmönster är antikroppnivåns ändpunkt. Vi rekommenderar denna teknik för att fastställa antikroppsnivåns ändpunkter.

Medelvärde och spridningsområdet för antikroppnivån (\pm en spädning på var sin sida om medelvärdet) har fastställts i vårt laboratorium och uppges som vägledning.

Denna kontroll tillhandahålls för att varje laboratorium skall ha tillgång till ANA-testningens reproducerbarhet (precision). Eftersom kontrollen inte är avsedd att vara en indikator på antikroppnivåns precision, bör varje laboratorium etablera sitt eget medelvärde för antikroppnivåns ändpunkt för provet i fråga och använda denna information för att få tillgång till reproducerbarheten (precisionen) mellan olika serier.

Genom upprepade analyser av denna titrerbara kontroll med användande av Immuno Concepts HEp-2000® Colorzyme® ANA-Ro-testsystem har ett medelantikroppvärde fastställts för varje lotnummer. Lotnumret, medelvärdet och spridningsområdet för antikroppnivån (\pm en dubbel spädning på vardera sidan om medelvärdet) anges på ampullens etikett och bör användas som vägledning för testsystemets prestanda.

Det är viktigt att inte blanda ihop färgningens intensitet med förekomst respektive avsaknad av antinukleära antikroppar. Den viktigaste faktorn att ta hänsyn till vid fastställande av om en viss serumspädning är positiv eller ej är om det förekommer ett klart urskiljningsbart mönster, oavsett färgningens intensitet.

Denna titrerbara kontroll uppvisar det typiska fläckiga mönster som är associerat med RNP-antikroppen. Det kan även finnas ett andra mönster av NSp I (flera åtskiljda fläckar i interfascellernas kärna), men det är det typiska RNP-fläckmönstret som skall användas för att avläsa ändpunkterna.

De värden som erhålls i vårt laboratorium kan skilja sig från era. Några av de många faktorer som kan påverka resultaten är, men är inte begränsat till:

1. Korrekt justering av mikroskopljusets bana. Se bruksanvisningen till mikroskopet för mer information.
2. Objektivets numeriska bländaröppning. Den numeriska bländaröppningen hänger ihop med ljussamlingskapaciteten och objektivets upplösning. Den numeriska bländaröppningen står angiven på sidan av objektivet.
3. Precision och exakthet i spädningsteknik, utrustning och testmetodernas prestanda.

TOLKNING AV PATIENTRESULTAT

200 gångers total förstoring rekommenderas för screening av positiv/negativ, medan 400 gångers total förstoring rekommenderas för mönsterigenkänning och påvisande av mitotiska celler.

Negativt: Ett serum betraktas som negativt för antinukleära antikroppar om nukleärfärgningen är mindre än eller lika med den negativa kontrollbrunnen, utan klart urskiljningsbart mönster. Cytoplasman kan uppvisa svag färgning, med ljusare färgning i de mitotiska cellernas icke-kromosomområde, men utan ett klart urskiljningsbart nukleärt mönster.

Positivt: Ett serum betraktas som positivt om kärnan uppvisar ett klart urskiljningsbart mönster av färgning i flertalet interfasceller.

SSA/Ro: Ett serum betraktas som positivt för SSA/Ro-antikroppar om 10-20 procent av interfaskärnorna uppvisar det distinkta SSA/Ro färgningsmönstret, det vill säga ett åtskiljt fläckigt mönster med en framträdande färgning av nukleolerna. Dessa är de överexpresserande transfekterade cellerna. Återstående 80-90 procent av interfaskärnorna kan, men behöver inte, uppvisa en finfläckig färgning av kärnan, med eller utan färgning av nukleolerna.

Antikroppnivåer: Vid avläsning av antikroppnivåerna börjar många laboratorier med att läsa den brunn som innehåller det mest spädda provet och läser "baklänges" till spädningen 1:40. Den första brunnen med ett klart urskiljningsbart mönster är antikroppnivåns ändpunkt. Vi rekommenderar denna teknik för att fastställa antikroppsnivåns ändpunkter. Det är viktigt att inte blanda ihop färgningens intensitet med förekomst respektive avsaknad av antinukleära antikroppar. Den viktigaste faktorn att ta hänsyn till vid fastställande av om en viss serumspädning är positiv är om det föreligger ett klart urskiljningsbart nukleärt mönster, oavsett färgningens intensitet. På grund av den ökade koncentrationen av SSA/Ro-antigen i de överexpresserande cellerna är det inte ovanligt att man ser färgning av dessa celler med mycket höga antikroppnivåer. Den kliniska betydelsen av sådana höga antikroppnivåer är inte känd.

WARNING: En del sera kan uppvisa nukleär och cytoplasmisk färgning utan ett synligt nukleärt mönster. Detta fenomen beror i allmänhet på heterofila antikroppar och bör rapporteras som negativt (32).

ENZYMFÄRGNINGENS INTENSITET

Färgningsgradens intensitet har inget bevisat kliniskt värde och endast begränsat värde som indikator på antikroppnivån (33). För att förenkla tolkningen skall screeningresultaten registreras som starkt positiva eller positiva och titreras därefter.

Starkt positiv reaktion: Mörk till mycket mörkblå färgning, tydlig cellkontur, klart definierat nukleärt mönster.

Positiv reaktion: Svag eller dämpad blå/mörklila färgning med större färgningsvariation mellan cellerna. Cellkonturen kan vara mindre väldefinierad i vissa celler, medan majoriteten av cellerna ändå uppvisar ett klart urskiljningsbart färgningsmönster.

OBSERVERA: Eftersom cellerna odlas direkt på objektglasytan, befinner sig inte alla celler i samma skede i cellcykeln. Det är inte ovanligt att man ser olika grad av färgningsintensitet från cell till cell på grund av skillnaderna i koncentration och plats för de olika antigenerna under cellcykeln.

RAPPORTERING AV RESULTATET

Screening: Resultaten skall rapporteras som starkt positiva eller positiva vid spädning 1:40, och det nukleära färgningsmönstret skall rapporteras.

Bestämning av antikroppnivå: Resultatet skall rapporteras som den sista seriespädningen med ett klart urskiljningsbart färgningsmönster. Resultat med en stark reaktion vid högsta utspädning ska rapporteras som större än den utspädningen. Antikroppnivåer på 1:40 till 1:80 betraktas som låga. 1:160 till 1:320 betraktas som medelhöga antikroppnivåer och 1:640 och mer betraktas som höga. Det är inte nödvändigt att bestämma titerens slutpunkt. Alla ANA-titer större än eller lika med 1: 640 betraktas som en hög titer och kommer att varna klinikern att göra ytterligare tester. Varje laboratorium bör upprätta sitt eget titerskema, baserat på antikroppar som upptäckts i patientpopulationen.

MÖNSTERDETEKTION

Homogen: En fast färgning av kärnan, med eller utan synbar maskering av nukleolerna. De metafasmitotiska cellernas kromosomområde är klart positivt med en jämn eller perifer färgningsintensitet större än, eller lika med, interfaskärnornas.

Synonymer: Diffus, fast.

Nukleära antigener: dsDNA, nDNA, DNP, histon.

Sjukdomssamband: Höga antikroppnivåer tyder på SLE. Låga antikroppnivåer tyder på SLE eller annan bindvävssjukdom (34).

Perifer: En fast färgning, främst runt kärnans yttre ring, med svagare färgning mot kärnans mitt. De metafasmitotiska cellernas kromosomområde är klart positivt med en jämn eller perifer färgningsintensitet större än, eller lika med, interfaskärnornas.

Synonymer: Kantig, raggig, hinnaktig.

Nukleära antigener: dsDNA, ssDNA, nDNA, DNP, histon.

Sjukdomssamband: Höga antikroppnivåer tyder på SLE. Lägre antikroppnivåer tyder på SLE eller annan bindvävssjukdom (34).

Fläckig: En grov- eller finkornig färgning av kärnan i allmänhet utan fluorescerande färgning av nukleolerna. De metafasmitotiska cellernas icke-kromosomområde uppvisar färgning, medan kromosomområdet är negativt.

Nukleära antigener: Sm; RNP; Scl-70; SSA/Ro; SSB/La och andra antigen/antikroppssystem som ännu inte är karaktäriserade.

Sjukdomssamband: Höga antikroppnivåer tyder på SLE (Sm-antigen), blandad bindvävssjukdom (RNP-antigen), sklerodermia (Scl-70-antigen) eller Sjögrens syndrom, även kallat Sicca-syndromet (SSA/Ro- eller SS-B-antigen). Lägre antikroppnivåer kan tyda på annan bindvävssjukdom (35).

Nukleolär: Stor, grovfläckig färgning inuti kärnan, i allmänhet mindre än sex stycken per cell, med eller utan enstaka fina fläckar, 5-10 stycken till antalet. De metafasmitotiska cellernas icke-kromosomområde uppvisar stark färgning, medan kromosomområdet kan ha en svag färgning. Anafasa och telofasa celler kan uppvisa liknande färgning som interfaskärnorna.

Nukleära antigener: Benämns allmänt 4-6s RNA och andra nukleära antigener, t ex fibrillarin, RNA polymeras I, NOR 90 och PM/Scl.

Sjukdomssamband: Höga antikroppnivåer vid sklerodermia och Sjögrens syndrom (36).

Centromer: Ett åtskilt fläckigt färgningsmönster som i hög grad tyder på CREST[§]-syndromvarianten av progressiv systemisk skleros (28). De nukleära fläckarna är mycket avskiljda och vanligtvis en multipel av 46 (oftast 23-46 fläckar per kärna). Eftersom centromerer är sammandragningar där spindelfibrer binds till kromosomerna uppvisar de mitotiska cellerna samma fläckreaktion i kromosomområdet (12).

Synonymer: ACA, åtskilt fläckig.

Nukleära antigener: Kromosom centromer (kinetochore).

Sjukdomssamband: Tyder i hög grad på CREST-syndromvarianten av progressiv systemisk skleros (28).

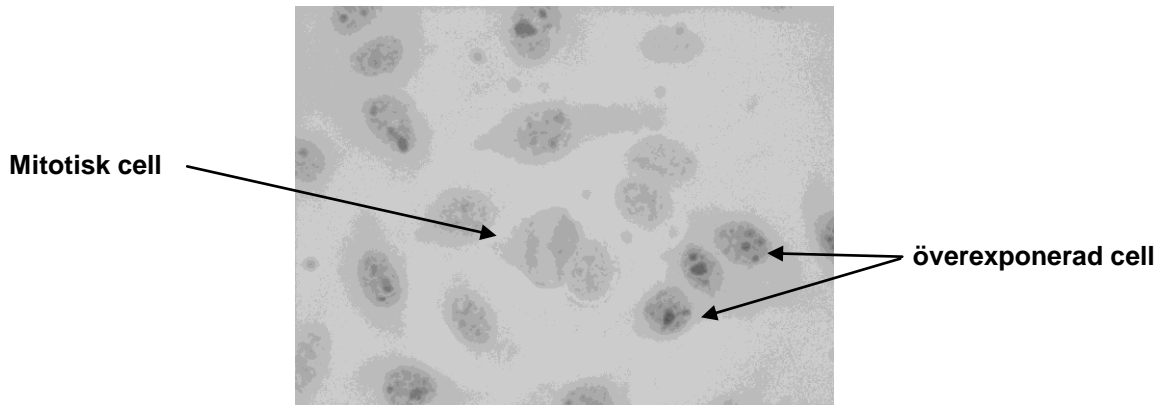
SSA/Ro: Ett distinkt ljusfläckigt mönster med framträdande färgning av nukleolerna i 10-20% av interfaskärnorna. Dessa är de överexpresserande transfekterade cellerna. De återstående 80-90% av interfaskärnorna kan, men behöver inte,

[§]CREST är en form av PSS med framskriden kalcinos, Raynaud-fenomen, esofageal dysfunktion, sklerodaktyli och telangiektasi.

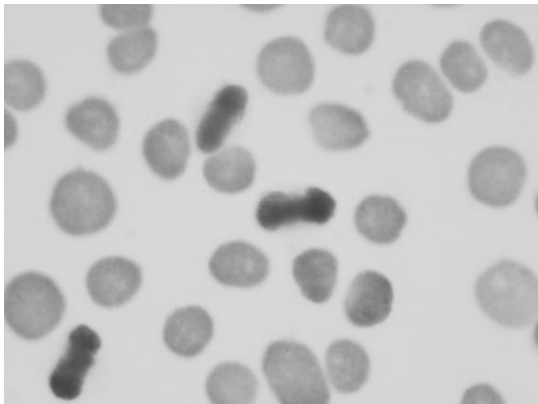
uppvisa en finfläckig färgning av kärnan med eller utan fluorescerande färgning av nukleolerna. De metafasmitotiska cellernas icke-kromosomområde uppvisar färgning, medan kromosomområdet är negativt.

Nukleära antigener: SSA/Ro (60kD).

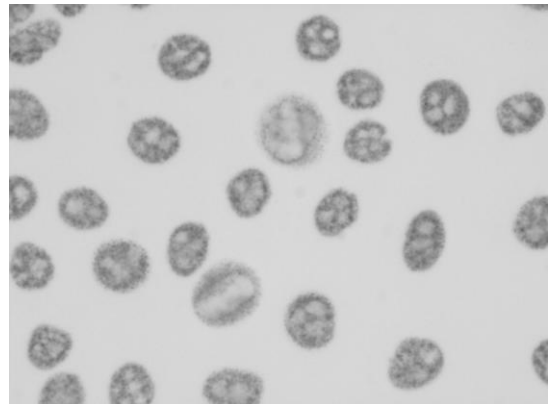
Sjukdomssamband: Noterat hos 60-70% av patienter med primär Sjögrens syndrom, 30-40% av patienter med SLE och mer än 95% av patienter med subakut kutan lupus (37).



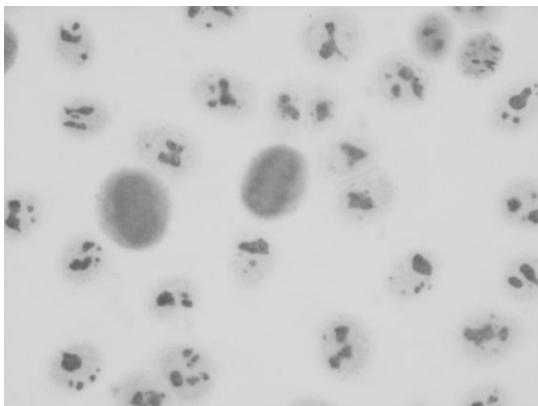
GRUNDFÄRGNINGSMÖNSTER



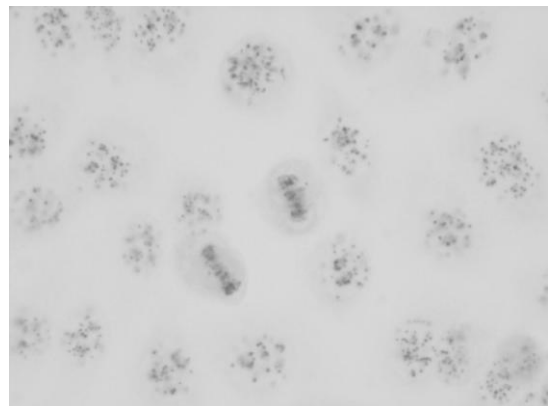
Homogent



Fläckigt



Nukleolärt



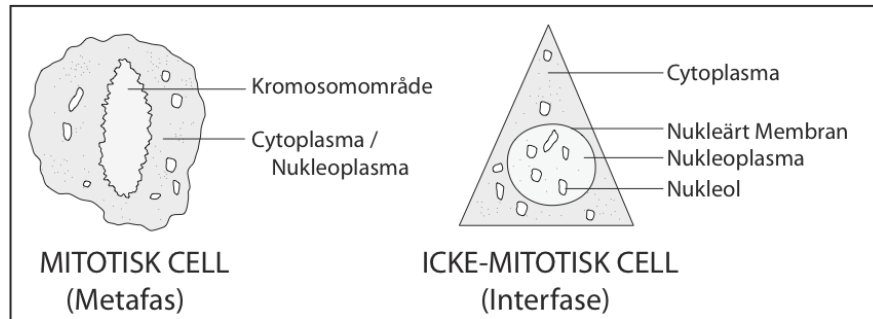
Centromert

MITOTISKA CELLER

DETEKTION

Mitotiska celler bör kunna synas i varje fält om man studerar dem i 200 gångers förstoring eller lägre. Studera cellen i 400 gångers förstoring för att bekräfta att en cell är i mitos. Mitotiska celler har en karaktäristisk rund form utan påvisbart nukleärt membran. Kromosomområdet i mitotiska celler har i allmänhet en oregelbunden form inuti cellen på grund av att nukleärmembran saknas och kromosomerna är extremt sammandragna.

Sera som är positiva för DNA, DNP och/eller histon (t ex Immuno Concepts homogena positiva kontroll) uppvisar ljus färgning av dessa cellers kromosomområde. I negativa DNA-, DNP- och/eller histonprov (t ex Immuno Concepts fläckiga positiva kontroll) uppvisar de mitotiska cellerna inte någon kromosomfärgning, och kan därför vara svåra att upptäcka.



ANVÄNDNING AV MITOTISKA CELLER

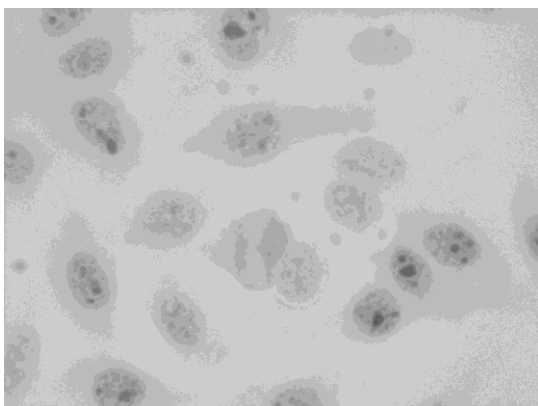
Urskiljning av fläckig kontra homogen antikropp: Ett finfläckigt färgningsmönster är ibland svårt att skilja från homogen färgning. Om mönstret är homogent, är de mitotiska cellernas kromosomer fast färgade. Om mönstret är strikt fläckigt, visar området utanför kromosomerna en finfläckig reaktion.

OBSERVERA: Om hela den mitotiska cellen är finfläckig samtidigt som kromosomområdet har en fast färgning, är det högst troligt att det finns två eller flera antikroppar. Rapportera screeningspådnigen som fläckig/homogen och titrera varje antikropp till dess ändpunkt.

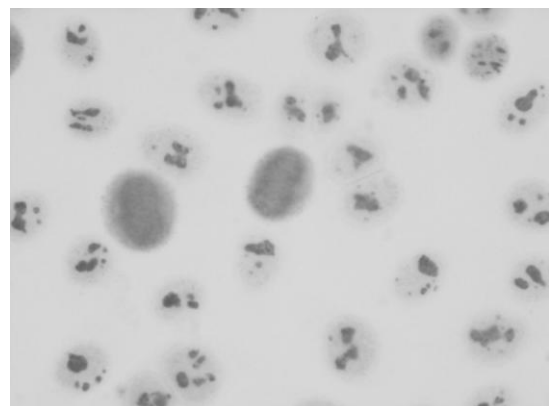
Perifer kontra nukleär membranantikropp: Antikroppar som uppvisar ett perifert mönster associeras i allmänhet med DNA/DNP-nukleära antigener. Höga antikroppnivåer av sådana antikroppar tyder på SLE. I substrat som inte innehåller mitotiska celler kan det perifera mönstret vara svårt att särskilja från nukleär membranantikropp. Genom att använda Immuno Concepts mitotiska celler går det att urskilja dessa mönster, eftersom de mitotiska cellernas kromosomområde färgas intensivt i ett perifert mönster, men inte färgas av en nukleär membranantikropp. Skillnaden är kliniskt betydelsefull, eftersom nukleära membranantikroppar inte har någon DNA-/DNP-specificitet och inte är associerade med SLE (38).

Anti-centromer antikropp (ACA) kontra atypiskt färgad antikropp som liknar en centromer: För att bekräfta anticentromerantikroppen bör kromosomregionen i de mitotiska cellerna färgas ljust med diskreta fläckar. Om kromosomområdet inte färgas är antikroppen inte en anticentromer och skall därför rapporteras som „atypiskt fläckigt“ (39).

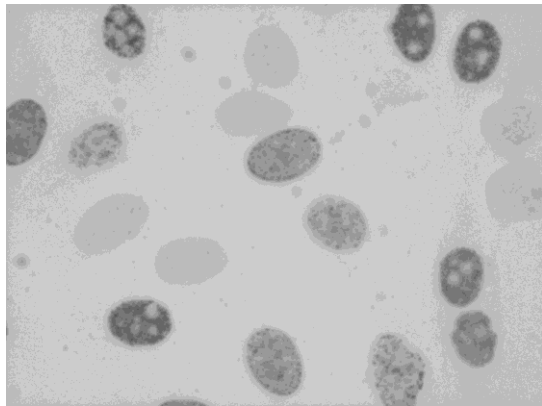
SSA/Ro kontra mönster som kan likna SSA/Ro-färgning: Den distinkta SSA/Ro-färgningen ses som ett distinkt ljusfläckigt mönster med framträdande färgning av nukleolerna i 10-20% av interfaskärnorna. De återstående 80-90% av interfaskärnorna kan, men måste inte, uppvisa en finfläckig färgning av kärnan med eller utan färgning av nukleolerna. Kromosomområdet i de metafasmittotiska cellerna uppvisar inte någon färgning. Det nukleolära mönstret kan särskiljas genom storfläckig färgning av hela kärnorna, i allmänhet färre än sex per cell. Scl-70-mönstret har finfläckig färgning och nukleolär färgning i alla interfaskärnor samt färgning av de metafasmittotiska cellernas kromosomala område. Antikroppar mot cellnukleär antigen i celldelning (PCNA) uppvisar varierande grova och fina fläckmönster i 30-50 procent av interfaskärnorna.



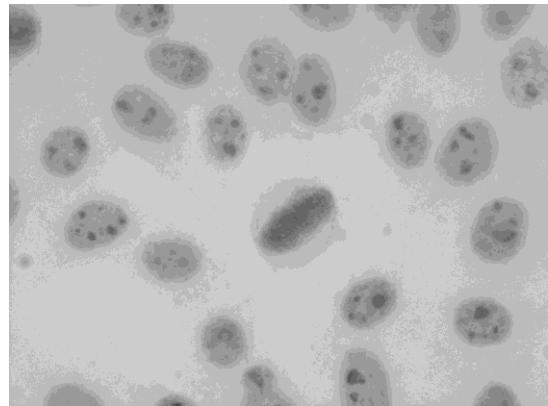
SSA/Ro



Nukleolärt



PCNA



Scl-70

CYTOPLASMISK FÄRGNING

Även om autoantikroppar mot cytoplasmiska antigener inte vanligtvis associeras med bindvävssjukdom, kan sådana antikroppar detekteras genom epiteliala cellstruktursubstrat (40). Mitokondriala och glatta muskelantikroppar är de två antikroppar som vanligtvis upptäcks och allmänt associeras med mononukleos, kroniskt aktiv hepatit och leversjukdom (41, 42). Med hjälp av HEp-2-cellsubstratet har den glatta muskelantikroppen även påvisats hos patienter med vårtor (43).

Antimitokondrial antikropp (AMA): Åtskiljda fläckar som är koncentrerade i cellens perinukleära område och utvidgade i lägre densitet till cytoplasmans yttre områden. Detta bör skiljas från anti-Golgi-antikroppen, som i allmänhet endast färgar ena sidan av det perinukleära området, och från antiribosomal antikropp, som uppvisar finare fläckar med ett nätförmigt utseende som överensstämmer med platsen för endoplasmisk reticulum inuti cellen.

OBSERVERA: Perinukleära fläckar kan enkelt särskiljas från perifer nukleärfärgning genom att de mitokondriska fläckarna bildar en avbruten fläckig färgning runt utsidan på det nukleära membranet, medan perifera sera bildar en fast och jämn färgning inuti det nukleära membranet.

RAPPORTERA SERA SOM NEGATIVT FÖR ANTINUKLEÄRA ANTIKROPPAR OCH BEKRÄFTA POSITIVT SVAR FÖR ANTIMITOKONDRISK ANTIKROPP PÅ AMA-SPECIFIKT SUBSTRAT.

Antiglatt muskelantikropp (ASMA): Mycket fin fibrös färgning över hela cellcytoplasmen med ett spindelvävsliknande utseende. Till skillnad från mitokondrisk antikropp är glatt muskelantikroppsfärgning likformig över hela cytoplasmen och kan även sträcka sig över kärnan. Mitotiska celler uppvisar i allmänhet stora, åtskiljda fläckar utanför kromosomområdet. Glatt muskelantikropp har visat sig ha hög specificitet för aktin (45, 46).

RAPPORTERA SERA SOM NEGATIVT FÖR ANTINUKLEÄR ANTIKROPP OCH BEKRÄFTA POSITIVT SVAR FÖR ANTIGLATT MUSKELANTI KROPP MED ASMA-SPECIFIKT SUBSTRAT.

TESTETS BEGRÄNSNINGAR

1. Diagnos kan inte ställas enbart på grundval av detektion av antinukleär antikropp. Resultaten måste tolkas av läkaren med hänsyn till patientens historia och symptom, de fysiska upptäckterna och övriga diagnostiska metoder.
2. Behandling bör inte påbörjas enbart på grundval av ett positivt test för antinukleära antikroppar. Kliniska symptom, andra laboratorieupptäckter och läkarens kliniska intryck måste beaktas innan eventuell behandling påbörjas.
3. Speciella läkemedel, inklusive procainamid och hydralazin, kan orsaka en lupus erytematos-liknande sjukdom (47). Patienter med läkemedelsinducerad LE kan uppvisa positiv homogen eller homogen/perifer ANA som i allmänhet är riktad mot nukleära histoner (48).
4. En liten procentandel patienter med SLE uppvisar eventuellt inte ANA med indirekt immunoenzymmetod, men kan uppvisa ANA med andra metoder (49).
5. Det är inte nödvändigt att bestämma titerens slutpunkt. Alla ANA-titer större än eller lika med 1: 640 betraktas som en hög titer och kommer att varna klinikern att göra ytterligare tester. Varje laboratorium bör upprätta sitt eget titerskema, baserat på antikroppar som upptäcks i patientpopulationen. Även om en högt titrerad ANA i hög grad kan tyda på bindvävssjukdom, bör detta inte betraktas diagnostiskt, utan snarare ses som en del av patientens totala sjukdomshistoria.
6. Färgningsmönstren ändras ofta i och med fortlöpande titring av sera. Detta beror i allmänhet på att det finns mer än en nukleär antikropp.
7. Positiva ANA kan även ses hos en liten procentandel patienter med smittsamma och/eller neoplastiska sjukdomar (9).

8. Autoantikroppar mot SSA/Ro uppvisar ett distinkt färgningsmönster i de HEp-2000[®]-transfekterade cellerna. När ett sådant mönster föreligger betraktas detta som ett bekräftande bevis på att det förekommer anti-SSA/Ro-antikroppar. Att ett sådant mönster saknas utesluter emellertid inte att det förekommer anti-SSA/Ro-antikroppar.
9. Eftersom SSA/Ro- antigenen har en överexpression i HEp-2000[®]-cellerna, uppvisar prover som innehåller anti-SSA/Ro-antikroppar högre antikroppnivåvärden med dessa celler än de värden som erhållits på icke-transfekterade HEp-2-celler. Eftersom ingen av de andra autoantigenerna i HEp-2000[®]-cellerna påverkas av transfectionsbehandlingen, uppvisar sera med andra autoantikroppspecifiteterna inga avsevärda skillnader i antikroppnivå mellan den transfekterade HEp-2000[®]-cellinjen och de icke-transfekterade HEp-2 cellerna.

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

I ett stort medicencentrum på ett universitet framställdes följande data över en tvåårsperiod med hjälp av HEp-2-cell ANA-substrat (49). Tabell 1.

TABELL 1

| Diagnos | Mönster-fördelning | % Positiv |
|--|--------------------|-----------|
| Onormal population (över 4500 sera testade): | | |
| Systemisk lupus erytematosus | S, P+H, H, P | 93 |
| Reumatoid artrit | S, H | 40 |
| Blandad bindvävssjukdom | S | 99 |
| Progressiv diffus systemisk skleros | S, N | 85 |
| Progressiv systemisk skleros-CREST | ACA | 93 |
| Reumatoid artrit hos barn | | |
| Systemisk | S | 14 |
| Polyartikularis | S | 13 |
| Pauciartikularis-B27+ | - | 0 |
| DM/PM | S | 25 |
| Vaskulit | S | 20 |
| Normal population (över 9000 sera testade): | | |
| 20-60 år | S | 2 |
| 70-80 år | S | 3,5 |

Förkortningar: S=Fläckig, H=Homogen, P=Perifer, N=Nukleolär, ACA=Anticentromer

PRESTANDA

NORMALA PROVER

Sera från 500 friska bloddonatorer, 242 kvinnor och 258 män, av vilka ingen har haft någon känd historia av reumatiska sjukdomar, testades parallellt med användande av kommersiellt tillgängliga, icke-transfekterade HEp-2-celler och HEp-2000[®] Colorzyme[®] ANA-Ro testsystem. I denna population uppvisade 36 prover (7,2%) positiva antinukleära antikroppstester vid 1:40 spädnings av serum. Färgningsmönstren var identiska för de båda substraten för 34 av de 36 positiva proverna. De båda prover som uppvisade skillnader kom båda från kvinnliga patienter, och för båda proverna bekräftades att de innehöll anti-SSA/Ro-antikroppar. Ett av dessa prover uppvisade en svag finfläckig reaktion med de icke-transfekterade HEp-2-cellerna och den typiska „SSA/Ro“-färgningen med HEp-2000[®] Colorzyme[®] ANA-Ro testsystem. Det andra provet var negativt med de icke-transfekterade HEp-2-cellerna, men uppvisade typisk „SSA/Ro“-färgning med HEp-2000[®] Colorzyme[®] ANA-Ro testsystem. De båda provernas SSA/Ro-specificitet bekräftades genom ELISA-analys och Western immunoblot. Prover som var negativa vid ANA-testerna var även negativa vid ELISA-analysen.

SERA FRÅN PATIENTER MED ENBART SSA/Ro-ANTIKROPPAR

Sera från 46 patienter med SLE eller Sjögrens syndrom testades med hjälp av kommersiellt tillgängliga icke-transfekterade HEp-2-celler och HEp-2000[®] Colorzyme[®] ANA-Ro-testsystem. Genom ELISA-analys och Western immunoblot bekräftades att all denna sera innehöll antikroppar mot SSA/Ro-autoantigenen. Inga andra autoantikroppar upptäcktes i något av dessa prov. Av dessa prover testades 36 (78%) positiva (med fläckigt mönster) med de icke-transfekterade HEp-2-cellerna och alla 46 (100%) testades positiva (distinkt SSA/Ro-färgningsmönster) med HEp-2000[®] Colorzyme[®] ANA-Ro-testsystem.

SERA FRÅN PATIENTER MED ANDRA AUTOANTIKROPPAR ÄN SSA/Ro

Serumprover från 230 patienter med olika reumatiska och icke-reumatiska sjukdomar testades parallellt med hjälp av kommersiellt tillgängliga icke-transfekterade HEp-2-celler och HEp-2000[®] Colorzyme[®] ANA-Ro-testsystem. Ett enkelt färgningsmönster noterades i 120 prover och blandade mönster i 110 prover. I den totala populationen av 230 prover var 333 färgningsmönster identiska med båda substraten. 29 prover uppvisade det distinkta „SSA/Ro“-färgningsmönstret

med HEp-2000[®]-Colorzyme[®] ANA-Ro testsystem. 23 av dessa prover uppvisade fläckiga mönster med de icke-transfekerade HEp-2-cellerna.

De sex avvikande proverna (positiva med HEp-2000[®], men negativa med icke-transfekerade HEp-2 celler) hade alla SSA/Ro-antikroppar, vilket det distinkta „SSA/Ro“-färgningsmönstret, ELISA-analyserna och Western blot-bekräftelsen visar.

JÄMFÖRELSE MELLAN OLIKA ANTIKROPPNIVÅER

Eftersom SSA/Ro- antigenen har en överexpression i HEp-2000[®]-cellerna uppvisar prover som innehåller anti- SSA/Ro-antikroppar högre antikroppnivåvärden med dessa celler än med icke-transfekerade HEp-2-celler. Eftersom ingen av de andra autoantigenerna i HEp-2000[®]-cellerna påverkas av transfektionsbehandlingen uppvisar sera med andra autoantikroppspecifiteteter inga avsevärda skillnader i antikroppnivå mellan den transfekerade HEp-2000[®]-cellinjen och de icke-transfekerade HEp-2 cellerna.

ANTI KROPPNIVÅS REPRODUCERBARHET

Tio prover tagna från CDC-kontroller och andra väl karakteriserade interna sera kördes på tre olika lotnummer av Hep-2000[®]-objektglas, vid tre olika tillfällen. Inte i något fall gav ett negativt prov positiva resultat. Alla antikroppnivåvärden inom en dubbel spädning av det fastställda medelantikroppvärdet för alla prover testades.

BEKRÄFTELSE PÅ SSA/Ro-ANTI KROPPAR

I ett stort reumatologiskt referenslaboratorium analyserades serumprover från 349 patienter med bekräftade positiva ANA-tester med hjälp av HEp-2000[®] Colorzyme[®] ANA-Ro testsystem. I denna utvalda population uppvisade 239 prover det distinkta SSA/Ro-färgningsmönstret. Positiva ELISA-analyser för SSA/Ro-antikroppar erhöles för 238 (99,6%) av dessa prover. Ytterligare 79 prover uppvisade starkt fläckiga och/eller homogena mönster och gav positiva ELISA-analyser för SSA/Ro-antikroppar. Om man ser det distinkta SSA/Ro-mönstret är detta därför en bekräftelse på att det förekommer SSA/Ro-antikroppar, medan avsaknad av mönstret inte utesluter att det kan finnas SSA/Ro-antikroppar i provet. I de studier som skisserats ovan har vi undersökt totalt 429 sera innehållande SSA/Ro-antikroppar. Dessa kan anses vara bekräftade genom ELISA-testning och/eller Western Immunoblots och de uppvisar det distinkta SSA/Ro-färgningsmönstret på den transfekerade HEp-2000[®] cellinjen. Vi har även sett prover som innehåller SSA/Ro-antikroppar, men som inte uppvisar det distinkta SSA/Ro-färgningsmönstret, eftersom höga nivåer av andra autoantikroppar (vanligtvis anti-DNA-antikroppar eller anti-Sm/RNP-antikroppar) maskerar SSA/Ro-mönstret. Om man ser det distinkta SSA/Ro-mönstret, är detta därför en bekräftelse på att det förekommer SSA/Ro-antikroppar i provet, medan avsaknad av mönstret inte utesluter att det kan finnas SSA/Ro-antikroppar.

BIBLIOGRAFI

1. Robbins, W.C., Holman, H.R., Delcher, H., et al. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96:575-579, 1979.
2. Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. *California Medicine* 104:463-469, 1966.
3. Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 7:379-390, 1964.
4. Tan, E. M. Autoimmunity to Nuclear Antigens. In: *The Cell Nucleus, Volume VII, Chromatin, Part D.* Ed. by H. Busch, pp. 457-477, New York, Academic Press, 1979.
5. Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 41:73-80, 1980.
6. Rekvig, O. P., Hannestad, K. The Specificity of Human Autoantibodies That React with Both Cell Nuclei and Plasma Membranes: The Nuclear Antigen is Present on Core Mononucleosomes. *J. Immunol.* 123:2673-2681, 1979.
7. Sondag-Tschroots, I. R. M. J., Aaij, C., Smit, J. W., et al. The Antiperinuclear Factor. 1. The Diagnostic Significance of the Antiperinuclear Factor for Rheumatoid Arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 38:248-251, 1979.
8. Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. *Hum. Pathol.* 9:85-91, 1978.
9. Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. *Semin. Arthritis Rheum.* 6:83-124, 1976.
10. Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. *J. Invest. Dermatol.* 62:526-534, 1974.
11. Douvas, A.S., Achten, M., Tan, E.M. Identification of a Nuclear Protein (Sci-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma. *Biol. Chem.* 245:10514 - 10522, 1979.
12. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., et al. Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77:1627-1631, 1980.
13. Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
14. Sharp, G. C., Irwin, W. S., Tan, E.M., et al. Mixed Connective Tissue Disease—An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to Extractable Nuclear Antigen (ENA). *Am. J. Med.* 52:148-159, 1972.
15. Sharp, G. C., Irwin, W. S., May, L. M., et al. Association of Antibodies to Ribonucleoprotein and Sm antigens with Mixed Connective Tissue Disease, Systemic Lupus Erythematosus and Other Rheumatic Disease. *N. Engl. J. Med.* 295:1149-1154, 1976.
16. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1073, 1975.
17. Alspaugh, M. A., Talal, N., Tan, E.M. Differentiation and Characterization of Autoantibodies and Their Antigens in Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 19:216-222, 1976.
18. Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
19. Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Serum Antibody in Rheumatoid Arthritis Reactive with a Cell-Associated Antigen. Demonstration of Precipitation and Immunofluorescence. *Arthritis Rheum.* 19:711-719, 1976.
20. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
21. Kozin, F., Fowler, M., Koeth, S.M. A Comparison of the Sensitivities and Specificities of Different Substrates for the Fluorescent Antinuclear Antibody Test. *Am. J. Clin. Pathol.* 74:785-790, 1980.
22. McCarty, G.A., Rice, J. R. Characterization and Comparison of Available Antinuclear Antibody Kits Using Single Pattern Index Sera. *J. Rheum.* 7:339-347, 1980.
23. Hahon, N., Eckert, H. L., Stewart, J. Evaluation of Cellular Substrates for Antinuclear Antibody Determinations. *J. Clin. Microbiol.* 2:42-45, 1975.
24. Cleymaet, J. E., Nakamura, R.M. Indirect Immunofluorescent Antinuclear Antibody Tests: Comparison of Sensitivity and Specificity of Different Substrates. *Am. J. Clin. Pathol.* 58:388-393, 1972.
25. Harmon C.E., Deng J.S., Peebles C.L., Tan E.M.: The importance of tissue substrate in the SSA/Ro/Ro antigen-antibody system. *Arthritis Rheum.* 27:166-173, 1984.
26. Maddison P.J., Provost T.T., Reichlin M.: Serological findings in patients with "ANA negative" systemic lupus erythematosus. *Medicine* 60:87-94, 1981.
27. Itoh Y., Rader M.D., Reichlin M.: Heterogeneity of the Ro/SSA/Ro antigen and autoanti-Ro/SSA response: evidence of the four antigenically distinct forms. *Clin. Exp. Immunol.* 81:45-51, 1990.
28. Tan, E.M., Rodnan, G. P., Garcia, I., et al. Diversity of Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 23:617-625, 1980.

29. Miyachi, K., Fritzler, M. J., Tan, E.M. Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. J. Immuno. 121:2228-2234, 1978.
30. McCarty, G. A., Barada, F. A., Snyderman, R., et al. A New Autoantibody Staining Pattern, the Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics, Clinical Occurrence, and Cytoskeletal Studies. Arthritis Rheum. 24:S109, 1981.
31. McCarty, G. A., Valencia, D. W., Fritzler, M. J. Antibody to Mitotic Spindle Apparatus: Immunologic Characteristics and Cytological Studies. J. Rheum. 11:213-218, 1984.
32. Peter, V.B., Dawkins, R. L. Evaluating Autoimmune Disease. Diagnostic Medicine. Sept. - Oct. 1979.
33. Nakamura, R. M., Peebles, C. L. Molden, D. P., Tan, E. M., Advances in Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases. Laboratory Medicine 15 (No. 3): 190-198 (1984).
34. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. Ann. Int. Med. 83:464-469, 1975.
35. McDuffie, F. C., Burch, T.N. Immunologic Tests in the Diagnosis of Rheumatic Diseases. Bull. Rheum. Dis. 27:900-911, 1976.
36. Ritchie, R.F. Antinucleolar Antibodies. Their Frequency and Diagnostic Application. N.Engl. J. Med. 282:1174-1178, 1970.
37. Chan, E. K. L., Andrade, L. E. C. Antinuclear Antibodies in Sjögren's Syndrome. Rheum. Dis. Clin. North Am. 18:551-570, 1992.
38. Nakamura, R.M., Peebles, C.L., Penn, G.M. Antibodies to Nuclear Antigens (ANA): Atypical Indirect Immunofluorescent Test for Antibodies to Nuclear Antigens (ANA) in a Case of Idiopathic Thrombocytopenia. Clinical Immunology Check Sample No. C-1-20. American Society of Clinical Pathologists, 1980.
39. Fritzler, M. J., Valencia, D.W., McCarty, G.A. Speckled Pattern Antinuclear Antibodies Resembling Anticentromere Antibodies. Arthritis Rheum. 27:92-96, 1984.
40. Gabbiani, G., Ryan, G.B., Lamelin, J.P., et al. Human Smooth Muscle Antibody. Am. J. Pathol. 72:473-488, 1973.
41. Mead, G.M., Cowin, P., Whitehouse, J.M.A. Antitubulin Antibody in Healthy Adults and Patients with Infectious Mononucleosis and its Relationship to Smooth Muscle Antibody (SMA). Clin. Exp. Immunol. 39:328-336, 1980.
42. Klatskin, G., Kantor, F.S. Mitochondrial Antibody in Primary Biliary Cirrhosis and Other Diseases. Ann. Int. Med. 77:553-541, 1972.
43. McMillan, S.A., Haire, M. Smooth Muscle Antibody in Patients with Warts. Clin. Exp. Immunol. 21:339-344, 1975.
44. Anderson, P., Small, J.V., Sobieszek, A. Studies on the Specificity of Smooth Muscle Antibodies. Clin Exp. Immunol. 26:57-66, 1976.
45. Lidman, K., Biberfeld, G., Fagraeus, A., et al. Anti-actin Specificity of Human Smooth Muscle Antibodies in Chronic Active Hepatitis. Clin. Exp. Immunol. 24:266-272, 1976.
46. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. Arch. Int. Med 117:620-626, 1966.
47. Fritzler, M.J., Tan, E.M. Antibodies to Histones in Drug-Induced and Idiopathic Lupus Erythematosus. J. Clin. Invest. 62:560-567, 1978.
48. Gladman, D.D., Chalmers, A., Urowitz, M.B. Systemic Lupus Erythematosus with Negative LE Cells and Antinuclear Factors. J. Rheum. 5:142-147, 1978.
49. Data on file. Duke University Medical Center, Durham, North Carolina.

Kontakta Immuno Concepts innan du använder produkten om skyddsöpackningen är skadad.



Fabrikant



Auktoriserad Representant
europeiska unionen



Temperatur
begränsning



Innehåller tillräckligt för <n> test



Se instruktionerna



In vitro diagnostiska medicinapparat



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
 Technical Support USA: 1.800.251.5115 Outside USA: 1.916.363.2649
 Email: technicalsupport@immunoconcepts.com

Cat 4000-Ro-I,

4.11.02.003.092-Sv

Rev 3.2 © Copyright 2020

HEP-2000® COLORZYME® ANA-RO TESTPROCEDUR

OM laboratoriet använder en robot för att analysera proverna så skall rekommendationerna från tillverkaren gälla. Roboten skall vara programmerad med anvisad provspädning, provvolym och inkubations tid som ni kan se nedan.

- 1. REKONSTITUERA BUFFERT (PBS)**
Lös upp innehållet i en buffertpåse i en liter avjoniserat eller destillerat vatten. PBS-bufferten kan täckas och förvaras i 2-25°C i maximalt fyra veckor.
- 2. REKONSTITUERA FÄRGREAGENS**
Lös upp innehållet i en påse i 150 ml avjoniserat eller destillerat vatten. Blanda väl tills preparatet har lösts upp helt och hållet. Denna färgreagens är stabil i 30 dagar i rumstemperatur i försluten behållare. Färgreagensen kan återanvändas i högst 30 dagar, eller tills det syns någon färgförändring eller fällning. Grumling eller opalescens utan synlig fällning vid återanvändning är normalt. Beroende på användningstakten kan 150 ml Colorzyme® färgreagens användas med maximalt tjugo objektglas.
- 3. SPÄD PATIENTPROV**
Screening: Späd patientprover till 1:40 genom att tillsätta 0,05 ml (50 µl) serum till 1,95 ml rekonstituerad PBS. Semikvantitativ bestämning av antikroppnivå: Gör dubbla seriespädningar av screeningprov (t ex 1:80, 1:160, 1:320...etc.) med användande av PBS.
- 4. FRAMSTÄLL SUBSTRATOBJEKTGLAS (20-25 µl/brunn)**
Tag bort objektglas(en) från påsen(-arna) och placera kontrollserat på kontrollbrunnarna på följande sätt: Vänd upp och ned på pipettflaskan och kläm försiktigt tills det syns en droppe på spetsen. För försiktigt droppen till rätt kontrollbrunn, men undvik direktkontakt mellan pipettspetsen och objektglasets yta. Tillsätt 1 droppe (20-25 µl) patientprov i de numrerade brunnarna.
OBSERVERA: För allmän screening rekommenderas den homogena positiva kontrollen. För semikvantitativ bestämning av antikroppnivå skall den positiva kontroll väljas som åskådliggör det färgningsmönster som är mest likt screeningprovet (använd t ex den fläckiga positiva kontrollen för patientprover som ger ett fläckigt färgningsmönster i screening). Om HEP-2000® ANA-Ro-test skall användas för att bekräfta förekomst av anti-SSA/Ro-antikroppar måste den SSA/Ro-positiva kontrollen, katalognummer 2035-Ro, köras på minst ett objektglas under den dagens körning.
VARNING: DIREKTKONTAKT MELLAN PIPETTSPETSEN OCH OBJEKTGLASETS YTA KAN LEDA TILL ATT ANTIGENSUBSTRATET TAR SKADA.
- 5. ODLING AV OBJEKTGLAS (30 ± 5 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-25°C)**
Placera objektglas(en) i en fuktig täckt kammare (en petriskål med fuktad pappershandduk duger). Odlas, med locket på, i 30 minuter (± 5 minuter) i rumstemperatur (18-25°C).
- 6. PBS-SKÖLJNING**
Avlägsna objektglas(-n) från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS genom att använda en sprufflaska, Pasteur, eller serologisk pipett. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.
OBSERVERA: Led PBS-flödet längs objektglasets mittlinje för att undvika korskontamination på trettonbrunnars objektglas genom att först luta glasets mot brunnarna 1-5 och därefter mot brunnarna 6-10.
- 7. PBS-TVÄTTNING (10 minuter)**
Tvätta objektglas(-n) under tio minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Denna tvättning kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas. Kassera PBS-tvättlösningen efter användning.
- 8. ENZYMEANTIKROPPREAGENS (Täck brunnarna med 12-14 droppar)**
Flytta ett objektglas åt gången från PBS och doppa 3-5 gånger i avjoniserat eller destillerat vatten. Knacka objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. Återför omedelbart objektglas till inkubationskammaren och täck brunnarna helt med enzymantikroppreagens. Börja med att placera en droppe i varje brunn. Upprepa detta för varje objektglas. Enzymantikroppreagensen har titrerats för att kompensera för det avjoniserade eller destillerade vatten som finns kvar på objektglasets efter sköljning.
OBSERVERA: Det är viktigt att objektglasbrunnarna inte torkar under detta förfarande, annars tar substratet skada.
TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT ALDRIG OBJEKTGLASET STÅ UTAN ENZYMEANTIKROPPREAGENS LÄNGRE ÄN FEMTON SEKUNDER.
- 9. ODLA OBJEKTGLASEN (30 ± 5 minuter i rumstemperatur, dvs 18-25°C)**
Placera lock på inkubationskammaren. Odlas objektglas(-n) under trettio minuter (± 5 minuter) i rumstemperatur (18-25°C).
- 10. PBS SKÖLJNING**
Avlägsna objektglas(-n) från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.
- 11. PBS-TVÄTTNING (10 minuter)**
Tvätta objektglas(-n) i 10 minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Denna tvättning kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas.
- 12. INKUBATION AV FÄRGREAGENS (30 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-25°C)**
Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS och doppa 3-5 gånger i avjoniserat eller destillerat vatten. Knacka därefter objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. Placera omedelbart objektglas(-n) i ett Coplin-kärl med aktiverad färgreagens och odla i 30 minuter.
- 13. PBS-SKÖLJNING**
Avlägsna ett objektglas åt gången från Coplin-kärl och skölj varje sida av objektglasets 4-5 sekunder med PBS. Spruta inte buffert direkt på brunnarna. Placera varje PBS-sköljt objektglas i ett Coplin-kärl fyllt med destillerat eller avjoniserat vatten tills alla objektglas har avlägsnats från färgreagensen. Gå direkt till steg 14.
- 14. MONTERA SKYDDSREMSA**
Avlägsna ett objektglas åt gången från avjoniserat eller destillerat vatten. Knacka objektglasets sida mot läskpapper eller pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. **TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT ALDRIG OBJEKTGLASET STÅ UTAN SKYDDSREMSA LÄNGRE ÄN FEMTON SEKUNDER.** Tillsätt 4-5 droppar halvpermanent monteringsmedium längs mittlinjen på varje objektglas. Sätt skyddsremsan försiktigt på plats och undvik luftfickor genom att försiktigt lägga ned skyddsremsan från objektglasets ena ände till den andra.
OBSERVERA: Överflödigt monteringsmedium på objektglasets kan leda till att cellerna inte får en tydlig upplösning (suddig bild). Överflödigt monteringsmedium kan avlägsnas från objektglasets genom att försiktigt torka skyddsremsan med läskpapper eller linspapper. Undvik att röra direkt vid skyddsremsan. Objektglasen kan avläsas direkt eller förvaras under en längre tid i 2-10°C utan att förlora reaktivitet.
TEKNISK HJÄLP: +1-916- 363-2649 eller e-mail: technicalsupport@immunoconcepts.com