

COLORZYME® ANA-TESTSYSTEM

**Nur zur in vitro-Diagnostik
Für Professionellen Gebrauch**

INDIKATION: Dies ist ein indirekter Enzym-Antikörpertest für den semiquantitativen Nachweis von antinukleären Antikörpern in humanem Serum. Der Test dient als Hilfestellung beim Nachweis von Antikörpern, die mit systemischen rheumatischen Erkrankungen assoziiert werden.

ZUSAMMENFASSENDE ERKLÄRUNG DES TESTS

Der Terminus antinukleäre Antikörper (ANA) ist ein Oberbegriff zur Beschreibung von Autoantikörpern gegen verschiedene Zellkernproteine. Frühere Studien dieser Autoantikörper, die mit Immunofluoreszenztechniken arbeiteten, haben einige wenige Spezifitäten von Zellkernproteinen aufgezeigt (1). Wegen der hohen Korrelation positiver ANA mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) ist diese Erkrankung bei negativen ANA grundsätzlich auszuschließen (2).

Auch wenn DNA-spezifische Antikörper weiterhin eine hohe Korrelation mit SLE (3) aufweisen, wurde eine Reihe nukleärer (4) und zytoplasmischer (5-7) Makromoleküle nachgewiesen und mit anderen Bindegewebserkrankungen in Verbindung gebracht (8-10). Einige dieser Antikörper haben offenbar einen diagnostischen und/oder prognostischen Wert bei progressiver systemischer Sklerose (11-12), gemischter Bindegewebskrankheit (13-15), Sjögren-Syndrom (16-17), Polymyositis (18) und/oder rheumatoider Arthritis (19). Aus diesem Grunde werden ANA-Tests mittlerweile als allgemeine Screening-Methode zum Nachweis von Bindegewebskrankheit anerkannt (20).

Die Sensitivität des ANA-Tests hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie Art des verwendeten Substrats, Fixierungsverfahren und den im Serum vorhandenen ANA-Typen. Zellkultursubstrate weisen im Allgemeinen eine höhere Sensitivität als Gewebeteile auf (21-24). Das Immuno Concepts Colorzyme® ANA-Testsystem mit mitotischen* Human-epitheloiden Zellen (HEp-2) stellt ein fortgeschrittenes System zum Nachweis von ANA dar. Es hat sich gezeigt, dass HEp-2 Zellen mit mitotischer Ausprägung eine höhere Sensitivität aufweisen und eine bessere Mustererkennung als die klassischen Nierensubstrate von Mäusen beim Nachweis von Antikörpern in progressiver systemischer Sklerose (PSS) bieten (25). Die mitotische Ausprägung hilft bei der Differenzierung der Mustererkennung sowie beim Nachweis von zuvor unbekanntem nukleären Antigenen, die in mitotisch aktiven Zellen in höheren Konzentrationen vorhanden sind (26-28).

TESTPRINZIP

Das Colorzyme® ANA-Testsystem von Immuno Concepts arbeitet mit der Technik der indirekten Enzym-Antikörper. Dabei werden Patientenproben mit Antigensubstrat inkubiert, um spezifische Bindungen von Autoantikörpern an Zellkerne zu ermöglichen. Wenn ANA vorhanden sind, bildet sich ein stabiler Antigen-Antikörperkomplex. Nach dem Waschen, bei dem nicht-spezifische Antikörper entfernt werden, wird das Substrat mit einem anti-Human-Antikörperreagens, das an Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, inkubiert. Bei positivem Ergebnis bildet sich ein stabiler dreiteiliger Komplex, bestehend aus an human-antinukleäre Antikörper gebundenen Enzym-Antikörpern, welche ihrerseits an Zellkern-Antigen gebunden sind.

*Der Terminus Mitose wird zur Beschreibung des Zellteilungsprozesses verwendet. Dieser Prozess lässt sich in sechs grundsätzliche Phasen gliedern: Interphase, Prophase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese.

Dieser Komplex kann durch Inkubation des Objektträgers in Farbreagens, das ein enzymespezifisches Substrat enthält, sichtbar gemacht werden. Die Reaktion zwischen enzymmarkiertem Antikörper und enzymespezifischem Substrat führt zu einer Verfärbung auf dem Objektträger, die unter einem gewöhnlichen Lichtmikroskop sichtbar ist. In positiven Proben weisen die Zellkerne eine dunkelblau bis purpurne Verfärbung mit einem für diese Zellkern-Antigenverteilung charakteristischen Muster innerhalb der Zellen auf. Wenn die Probe für ANA negativ ist, zeigt der Zellkern keine deutliche Zellkernverfärbung. Das Zytoplasma kann eine schwache Verfärbung aufweisen, wobei der außerhalb des Chromosomen liegende Bereich mitotischer Zellen eine dunklere Verfärbung aufweisen kann.

SYSTEMKOMPONENTEN - IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

Verwendung: Sämtliche Komponenten werden gebrauchsfertig geliefert, ohne dass Aliquotieren oder eine Rekonstitution erforderlich sind (mit Ausnahme von PBS-Puffer und Farbreagens, die vor Gebrauch in deionisiertem oder destilliertem Wasser aufgelöst werden müssen).

Aufbewahrung: Alle Komponenten können gekühlt bei 2-10°C aufbewahrt werden. Nach Rekonstitution sollte PBS-Puffer in Behälter mit Schraubverschluss gespeichert und zwischen 2-25°C gelagert werden. Nach Rekonstitution kann Colorzyme® Farbreagens im geschlossenen Behälter bei Raumtemperatur bis zu 30 Tage lang aufbewahrt werden. Je nach Gebrauchshäufigkeit können 150 ml Colorzyme® Farbreagens mit bis zu 20 Objektträgern verwendet werden.

Stabilität: Alle Komponenten sind bis mindestens 12 Monate nach Herstellungsdatum stabil. Keine Komponenten nach Überschreiten des Verfallsdatums verwenden.

REAKTIVE REAGENZIEN

Substratträger [SLIDE]: Objektträger für ANA-Substrat mit direkt in den Testvertiefungen stabilisierten HEp-2 Zellen (mit mitotischer Ausprägung). Durch eine spezielle Konstruktion wird die Gefahr der Kreuzkontamination der Vertiefungen bei den Tests minimiert. Der Objektträgerbeutel ist mit einem inaktiven nicht-toxischen Gas gefüllt, das zur Stabilität der Zellen beiträgt.

Homogenes Positivkontrolle [CONTROL] +: Katalognummer 2021. Gebrauchsfertiger Tropfer mit 1,0 ml positivem Human-Kontrollserum mit DNA- und/oder DNP-Zellkern-spezifischen Antikörpern. Dieses Serum zeigt eine homogene Färbung auf HEp-2 Zell-Substraten von Immuno Concepts. Der Chromosombereich mitotischer Zellen zeigt dieselbe homogene Färbung.

Gefleckte Positivkontrolle [CONTROL] +: Katalognummer 2022. Gebrauchsfertiger Tropfer mit 1,0 ml positivem Human-Kontrollserum mit Sm- und/oder RNP-Zellkern-Antigen-spezifischen Antikörpern. Dieses Serum weist eine häufig anzutreffende fleckige Verfärbung auf HEp-2 Zell-Substrat von Immuno Concepts auf. Der Chromosombereich mitotischer Zellen zeigt eine negative Färbung.

Nukleolus-Positivkontrolle [CONTROL] +: Katalognummer 2023. Gebrauchsfertiger Tropfer mit 1,0 ml positivem Human-Kontrollserum mit Nukleolus-Antigen-spezifischen Antikörpern. Dieses Serum zeigt eine nukleolare Färbung auf HEp-2 Zell-Substraten von Immuno Concepts auf.

Zentromer-Positivkontrolle [CONTROL] +: Katalognummer 2025. Gebrauchsfertiger Tropfer mit 1,0 ml positivem Human-Kontrollserum mit Chromosom-Zentromer-spezifischen Antikörpern (Kinetochor). Dieses Serum zeigt eine diskrete Fleckenbildung und Färbung auf HEp-2 Zell-Substraten von Immuno Concepts auf. Der Chromosombereich mitotischer Zellen zeigt dieselbe diskrete Fleckenbildung und Färbung.

Titrierbares Kontrolle [TC]: Katalognummer 2026. Gebrauchsfertiges Fläschchen mit 0,5 ml positivem Human-Kontrollserum zur unverdünnten Verwendung als Patientenprobe. Siehe Etikett für Titrierungswert.

Negativkontrollserum [CONTROL] -: Katalognummer 2031. Gebrauchsfertiger Tropfer mit 1,0 ml negativem Human-Kontrollserum. Auch wenn das Negativkontrollserum eine schwache Fluoreszenz des Zytoplasma aufweist, wobei der außerhalb des Chromosomen liegende Bereich der mitotischen Zelle eine hellere Färbung aufweist, zeigt sich kein deutliches Färbungsmuster im Zellkern.

Enzym-Antikörperreagens [CONJ|HRP]: Katalognummer 4009 (9,0 ml), 4075 (23 ml). Anti-human-IgG, an Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert. Gebrauchsfertiges Reagens in Präzisions-Tropffläschchen mit 9,0 ml für alle 10 Objektträger im Lieferumfang des Testkits.

Farbreagens [PWDR|CRP]: Katalognummer 4066. HRP-spezifisches Enzym-Substratpulver, enthält 4-Chloro-1-Naphthol. Jede Packung enthält Pulver für 150 ml selbstaktivierendes Colorzyme® Farbreagens.

Herstellung: Inhalt eines Beutels mit 150 ml deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Gut durchmischen, bis das Pulver völlig aufgelöst ist. Dieses Farbreagens ist 30 Tage stabil, wenn es bei Raumtemperatur in einem geschlossenen Behälter aufbewahrt wird. Dieses Farbreagens kann bis zu 30 Tage lang, oder bis eine Farbänderung oder Ausfällung zu beobachten ist, wiederverwendet werden. Trübungen oder Schimmern bei Wiederverwendung, ohne sichtbare Ausfällungen, sind normal. Je nach Gebrauchshäufigkeit können 150 ml Colorzyme® Farbreagens mit bis zu 20 Objektträgern verwendet werden.

NICHT-REAKTIVE KOMPONENTEN

PBS-Waschpuffer **PWDR|PBS**: Katalognummer 1011. Phosphat-gepuffertes Kochsalzpulver (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Jeder Beutelinhalt reicht für 1 Liter gebrauchsfertigen Puffer. (Ein Beutel Pufferpulver für je fünf Objektträger ist im Lieferumfang des Testkits enthalten).

Herstellung: Einen Beutel Pufferpulver in 1 Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen und speichern. Sie zwischen 2-25°C bis zu 4 Wochen aufbewahren, oder bis Anzeichen von Kontamination oder andere sichtbare Veränderungen zu erkennen sind.

Semipermanentes Montagemedium **SOLN|MM**: Katalognummer 1111. Gebrauchsfertiges Tropf-Fläschchen mit 5,0 ml Glycerol-basiertem Montagemedium.

Deckgläser **CVSLP**: Katalognummer 1042. Jede Packung enthält zehn Deckgläser 24 x 64 mm Nr. 1.

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN - NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN

Präzisionspipetten für Volumina von 20-25 µl
Drei Coplin-Glaszylinder oder Färbungsschalen
Spritzflasche oder Pasteur-Pipetten
Serologische Pipetten
Mehrere 1-Liter-Behälter mit Schraubverschluss (für PBS-Waschpuffer)
Geschlossener Behälter zur Aufbewahrung von Colorzyme® Farbreagens
Deionisiertes oder destilliertes Wasser
Teströhrchen zur Herstellung von Serumverdünnungen
Saugpapier oder Papierhandtücher
Inkubationskammer
Einmalhandschuhe
Laborstoppuhr
Standard-Lichtmikroskop mit 200- und 400-facher Vergrößerung

SICHERHEITSHINWEISE

1. Sämtliche für dieses Produkt verwendeten Materialien menschlichen Ursprungs wurden nach von der FDA anerkannten Methoden negativ (nicht wiederholt reaktiv) auf Antikörper gegen HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C (HCV) und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAG) getestet. Keine Testmethode kann jedoch mit absoluter Sicherheit nachweisen, dass keine HIV-1, HIV-2, Hepatitis-C oder Hepatitis-B-Viren oder andere infektiöse Agenten vorhanden sind. Daher sollten alle Kitbestandteile wie potenziell infektiöse Materialien gehandhabt werden.
2. Alle Patientenproben sollten nach den Anforderungen für Biosafety Level 2 behandelt werden, wie für potenziell infektiöses humanes Serum und andere Blutbestandteile empfohlen in: Centers for Disease Control / National Institutes of Health Manual: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition*.
3. Ein Verdünnen der Bestandteile oder eine Zugabe von nicht zum Kit gehörenden Reagenzien kann die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (0,09%) als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferinstallationen reagieren und hochexplosive Metallazidsalze bilden. Beim Entsorgen der Reagenzien mit reichlich Leitungswasser nachspülen, damit im Abfluss keine Rückstände verbleiben. Natriumazid ist giftig und kann bei Verschlucken toxisch wirken.
5. Der Kit ist ausschließlich zur *In vitro*-Diagnostik bestimmt.
6. Falls hämolysierte oder lipämische Seren verwendet werden müssen, die Seren durch Hitzeeinwirkung (30 Minuten bei 56°C) inaktivieren, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Mikrobiell kontaminierte Seren dürfen nicht verwendet werden.
7. Das titrierbare Kontrollserum ist für die Überwachung der Chargen- und Testlauf-übergreifenden Reproduzierbarkeit bestimmt. Es ist nicht zur Messung der Gesamtsensibilität oder Spezifität des Tests bestimmt.

8. In Bereichen, in denen mit Patientenproben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
9. Verspritzen von Reagenzien und Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
10. Die angegebenen Inkubationszeiten und Temperaturwerte genau einhalten, andernfalls könnten die Ergebnisse verfälscht werden.
11. Eine Kreuzkontamination der Reagenzien oder Proben kann ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.
12. Wiederverwendbare Glasartikel müssen vor Gebrauch gewaschen und gründlich ausgespült werden, um sämtliche Waschmittelrückstände zu entfernen. Die Glasartikel müssen vor Gebrauch sauber und trocken sein.
13. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien, Objektträger und Proben auf Zimmertemperatur (18-25°C) gebracht werden.
14. Beim Arbeiten mit Proben und Reagenzien sind grundsätzlich Einmalhandschuhe zu tragen. Danach gründlich Hände waschen.
15. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien oder Proben kann das Ergebnis verfälschen.
16. Niemals mit dem Mund pipettieren und Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden. Bei Kontakt mit viel Wasser und desinfizierender Seife waschen.
17. Dieses Farbreagens kann bis zu 30 Tage lang, oder bis eine Farbänderung oder Ausfällung zu beobachten ist, wiederverwendet werden. Trübungen oder Schimmern bei Wiederverwendung, ohne sichtbare Ausfällungen, sind normal. Je nach Gebrauchshäufigkeit können 150 ml Colorzyme® Farbreagens mit bis zu 20 Objektträgern verwendet werden.

PROBENGEWINNUNG

Probenentnahme: Nach Möglichkeit sollten Serumproben hergestellt werden. Dazu durch Venenpunktion in ein steriles Vakuumröhrchen oder durch ein anderes geeignetes Blutnahmesystem aseptisch ca. 5 ml Vollblut entnehmen. Das Blut bei Zimmertemperatur (18-25°C) gerinnen lassen. Danach muss das Serum so bald wie möglich durch Zentrifugation abgetrennt werden, um Hämolyse zu vermeiden.

Störsubstanzen: Stark hämolytische, lipämische oder durch Mikrobenwachstum verunreinigte Seren sowie Seren von Ikteruspatienten dürfen nicht verwendet werden, weil diese Zustände zu falschen Ergebnissen führen können. Proben mit sichtbaren Verunreinigungen müssen vor Verwendung zentrifugiert werden.

Aufbewahrung: Serumproben können bei einer Temperatur von 2-10°C maximal eine Woche lang aufbewahrt werden. Sollen die Proben länger aufbewahrt werden, müssen sie bei mindestens -20°C eingefroren werden. Serum darf nicht in einem Kühlschrank oder Gefrierschrank mit Abtauautomatik gelagert werden.

ACHTUNG: Wiederholtes Einfrieren / Auftauen von Patientenproben ist zu vermeiden. Andernfalls können falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse auftreten.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

QUALITÄTSSICHERUNG

Positiv-, Negativ- und PBS-Kontrollen müssen in jeweils einzelnen Durchläufen erfolgen. Die positive Kontrollvertiefung sollte eine dunkelblau bis purpurne Verfärbung im Zellkern aufweisen, mit einem deutlichen Muster wie es für das verwendete Kontrollserum charakteristisch ist. Das Zytoplasma kann in der positiven Kontrollvertiefung eine hellblau bis purpurne Färbung annehmen. Die Negativkontrolle sollte eine hellblau bis purpurne Verfärbung in Zytoplasma und Nukleus aufweisen, jedoch ohne deutliches Muster einer Verfärbung des Zellkerns. Die PBS-Kontrollvertiefung wird zur Beobachtung nicht-spezifischer Verfärbungen durch das Enzym-Antikörper-Reagens verwendet und sollte keine Blaufärbung aufweisen. Wenn die Kontrollvertiefungen nicht die beschriebenen Merkmale aufweisen, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

OPTIONALE TITRIERBARE KONTROLLE

Beim Auswerten der Titrierungen beginnen viele Labore mit der Vertiefung, die die Probe mit der größten Verdünnung enthält, und fahren mit der Auswertung „nach hinten“ zur 1:40-Verdünnung fort. Die erste Vertiefung, in der eine deutliche Verfärbung des Zellkerns sichtbar ist, ist der Titrierungsendpunkt. Wir empfehlen diese Vorgehensweise zur Bestimmung des Titrierungsendpunkts.

In unserem Labor wurde der mittlere Titrierungsbereich (\pm eine Verdünnung nach oben oder unten, vom Mittel ausgehend) festgelegt; dieser gilt als Richtwert. Mit Hilfe dieser Kontrolle kann jedes Labor die Reproduzierbarkeit (Präzision) seiner ANA-Tests selbst einschätzen. Da diese Kontrolle nicht als Indikator für die Titrierungsgenauigkeit vorgesehen ist, muss jedes Labor seinen eigenen mittleren Titrierungsendpunkt für diese Probe festlegen und sollte diese Informationen zur Bewertung der Reproduzierbarkeit (Präzision) ihrer Testläufe heranziehen.

Für jede Chargennummer wurde durch mehrere Testläufe mit dieser titrierbaren Kontrolle, unter Verwendung des Colorzyme® ANA-Testsystems von Immuno Concepts, ein mittlerer Titrierungswert ermittelt. Chargennummer, mittlere Titrierung und Titrierungsbereich (\pm eine Zweifach-Verdünnung nach oben oder unten, ausgehend vom Mittel) sind auf dem Etikett des Fläschchens verzeichnet und sollten zur Messung der Systemleistung herangezogen werden.

Es ist wichtig, die Intensität der Verfärbung nicht mit dem Vorhandensein bzw. Fehlen von antinukleären Antikörpern zu verwechseln. Der entscheidende Faktor, ob die Bestimmung einer gegebenen Serumverdünnung als positiv zu werten ist, ist das Vorhandensein eines deutlichen Musters, unabhängig von der Intensität der Verfärbung.

Diese titrierbare Kontrolle zeigt die mit RNP-Antikörpern assoziierte typische Fleckenbildung. Es kann auch ein zweites Muster von NSp I auftreten (mehrere diskrete Flecken im Nukleus der Interphase-Zellen), entscheidend für den Endpunkt ist jedoch das typische RNP-Fleckenmuster.

Die in unserem Labor ermittelten Werte können von Ihren eigenen Werten abweichen. Zahlreiche Faktoren können Einfluss auf Ihre Ergebnisse nehmen; hier einige Beispiele:

1. Korrekte Ausrichtung des Lichtwegs im Mikroskop. Dazu die Anweisungen in der Gebrauchsanweisung zu Ihrem Mikroskop lesen.
2. Die Blendenöffnung des Objektivs. Die Blendenöffnung bestimmt die Menge des aufgenommenen Lichts und die Auflösung des Objektivs. Die Blendenöffnung ist seitlich am Objektiv aufgedruckt.
3. Präzision und Genauigkeit der Verdünnungstechnik, der Ausrüstung und der Ausführung der Testverfahren.

INTERPRETATION DER PATIENTENERGEBNISSE

Für das Positiv-/Negativ-Screening wird eine 200-fache Vergrößerung empfohlen, eine 400-fache Vergrößerung hingegen wird zur Mustererkennung und zum Betrachten mitotischer Zellen empfohlen.

Negative Reaktion: Ein Serum ist als negativ für antinukleäre Antikörper zu werten, wenn die Verfärbung des Nukleus geringer als oder gleich der negativen Kontrollvertiefung und kein deutliches Muster zu erkennen ist. Das Zytoplasma kann eine schwache Verfärbung aufweisen, wobei der außerhalb des Chromosomen liegende Bereich mitotischer Zellen eine hellere Verfärbung zeigt und kein deutliches Muster im Nukleus zu erkennen ist.

Positive Reaktion: Ein Serum ist als positiv zu werten, wenn der Zellkern der meisten Interphase-Zellen eine deutlich sichtbare Verfärbung aufweist.

Titrierungen: Beim Auswerten der Titrierungen beginnen viele Labore mit der Vertiefung, die die Probe mit der größten Verdünnung enthält, und fahren mit der Auswertung „nach hinten“ zur 1:40-Verdünnung fort. Die erste Vertiefung, in der eine deutliche Verfärbung sichtbar ist, ist der Titrierungsendpunkt. Wir empfehlen diese Vorgehensweise zur Bestimmung des Titrierungsendpunkts. Es ist wichtig, die Intensität der Verfärbung nicht mit dem Vorhandensein bzw. Fehlen von antinukleären Antikörpern zu verwechseln. Der entscheidende Faktor, ob die Bestimmung einer gegebenen Serumverdünnung als positiv zu werten ist, ist das Vorhandensein eines deutlich erkennbaren Musters, unabhängig von der Intensität der Verfärbung.

ACHTUNG: Einige Seren können eine Verfärbung des Nukleus und des Zytoplasma ohne deutliches Muster aufweisen. Dieses Phänomen ist im Allgemeinen auf heterophile Antikörper zurückzuführen und ist als negativ zu werten (29).

ENZYM-VERFÄRBUNG

Der Grad der Verfärbung hat keinen nachweisbaren klinischen Wert und nur begrenzten Wert als Titrierungs-Indikator (30). Um die Interpretation zu vereinfachen, Screening-Ergebnisse als stark positiv oder positiv werten und entsprechend titrieren.

Stark positive Reaktion: Dunkelblau bis stark dunkelblau-purpurne Verfärbung mit klar erkennbarer Zellkontur und klar definiertem Zellkernmuster.

Positive Reaktion: Schwache oder unterschwellige Blau- bis Purpurfärbung mit größeren Abweichungen zwischen den Zellen. Die Zellkontur kann bei einigen Zellen weniger klar definiert sein, wobei die Mehrzahl der Zellen immer noch eine deutlich sichtbare Verfärbung aufweist.

HINWEIS: Da die Zellen direkt auf der Oberfläche des Objektträgers kultiviert werden, durchlaufen nicht alle Zellen die gleiche Zyklusphase. Unterschiedliche Verfärbungsintensität zwischen den Zellen ist auf Grund der unterschiedlichen Konzentrationen und Standorte der verschiedenen Antigene im Verlauf eines Zellzyklus nicht ungewöhnlich.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Screening: Die Ergebnisse sind bei der 1:40-Verdünnung als stark positiv oder positiv zu werten, die Verfärbungscharakteristik des Nukleus ist festzuhalten.

Titrierung: Die letzte Reihenverdünnung, in der eine deutliche Verfärbung sichtbar ist, ist als Ergebnis anzugeben. Ergebnisse mit einer starken positiven Verfärbung bei der höchsten Verdünnung sollten berichtet werden mit grosser als diese Verdünnung (>1:höchste Verdünnung). Titrierungen von 1:40 bis 1:80 sind als niedrige Titrierungen anzusehen; Titrierungen von 1:160 bis 1:320 sind als mittlere Titrierungen und Titrierungen von 1:640 und größer sind als hohe Titrierungen anzusehen. Es ist nicht erforderlich, den Titerendpunkt zu bestimmen. Jeder ANA-Titer größer oder gleich 1: 640 gilt als hoher Titer und weist den Kliniker auf die Notwendigkeit zusätzlicher Tests hin. Jedes Labor sollte sein eigenes Titterschema etablieren, basierend auf den Antikörpern die in der Patientenpopulation nachgewiesen werden. Die Durchführung einer Endpunkt Titration zeigt jedoch alle in der Probe enthaltenen Muster welche oft maskiert werden und vermeidet damit Diskrepanzen zu den Folgetesten.

MUSTERERKENNUNG

Homogen: Eine deutliche Verfärbung des Nukleus mit oder ohne sichtbare Maskierung der Nucleoli. Der Chromosombereich von mitotischen Metaphase-Zellen ist deutlich positiv, mit einer gleichmäßigen oder peripheren Verfärbungsintensität, größer oder gleich dem Interphasen-Nukleus.

Synonyme Bezeichnung: Diffus; fest.

Nukleäre Antigene: dsDNA; nDNA; DNP; Histon.

Assoziierte Erkrankung: Hohe Titrierungen lassen auf SLE schließen. Niedrige Titrierungen lassen auf SLE oder andere Bindegewebskrankheiten schließen (31).

Peripher: Eine deutliche Verfärbung, vor allem im Außenbereich des Nukleus, mit schwächerer Verfärbung zur Zellkernmitte hin. Der Chromosombereich von mitotischen Metaphase-Zellen ist deutlich positiv, mit einer gleichmäßigen oder peripheren Verfärbungsintensität, größer oder gleich dem Interphasen-Nukleus.

Synonyme Bezeichnung: Rand, zottelig, membranös.

Nukleäre Antigene: dsDNA; ssDNA, nDNA; DNP; Histon.

Assoziierte Erkrankung: Hohe Titrierungen lassen auf SLE, niedrigere Titrierungen lassen auf SLE oder andere Bindegewebskrankheiten schließen (31).

Fleckig: Eine grobe oder feine Granularverfärbung des Nukleus, im Allgemeinen ohne fluoreszente Verfärbung der Nucleoli. Der Bereich außerhalb des Chromosoms mitotischer Zellen zeigt eine Verfärbung, der Chromosombereich bleibt jedoch ohne Verfärbung.

Nukleäre Antigene: Sm; RNP; Scl-70; SSA/Ro; SSB/La sowie andere noch nicht näher beschriebene Antigen-/Antikörpersysteme.

Assoziierte Erkrankung: Hohe Titrierungen lassen auf SLE (Sm Antigen), gemischte Bindegewebskrankheit (RNP Antigen), Sklerodermie (Scl-70 Antigen) oder Sjögren-Syndrom-Sicca-Komplex (SSA/Ro oder SSB/La Antigen) schließen. Niedrigere Titrierungen lassen auf andere Bindegewebskrankheiten schließen (32).

Nukleolar: Große grobfleckige Verfärbungen des Nukleus, im Allgemeinen weniger als 6 pro Zelle, mit oder ohne kleinere feine Flecken, 5-10 an der Zahl. Der Bereich außerhalb des Chromosoms mitotischer Metaphase-Zellen zeigt eine starke Verfärbung, der Chromosombereich zeigt jedoch nur eine schwache Verfärbung. Anaphase- und Telophase-Zellen weisen u.U. eine ähnliche Verfärbung wie Interphase-Zellkerne auf.

Nukleäre Antigene: Im Allgemeinen als 4-6s RNAs bezeichnet sowie andere nukleäre Antigene wie Fibrillarin, RNA Polymerase I, NOR 90 und PM/Scl.

Assoziierte Erkrankung: Hohe Titrierungen, vor allem bei Sklerodermie und Sjögren-Syndrom (33).

Zentromer: Eine diskrete fleckige Verfärbung, die stark auf das CREST[§] Syndrom schließen lässt, eine Variante der progressiven systemischen Sklerose (25). Die Flecken im Nukleus sind sehr diskret und in der Regel ein Vielfaches von 46 (meist 23-46 Flecken pro Nukleus). Da es sich bei Zentromeren um Bündelungen handelt, wobei Spindelfasern an den Chromosomen anhaften, weisen mitotische Zellen im Chromosombereich dieselbe Fleckenbildung auf (12).

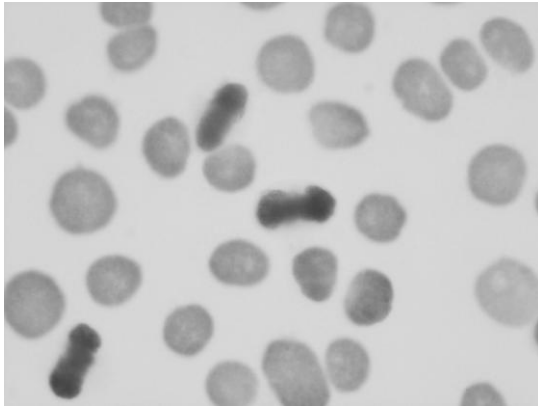
Synonyme Bezeichnung: ACA; diskrete Fleckenbildung.

Nukleäre Antigene: Chromosomen-Zentromer (Kinetochor).

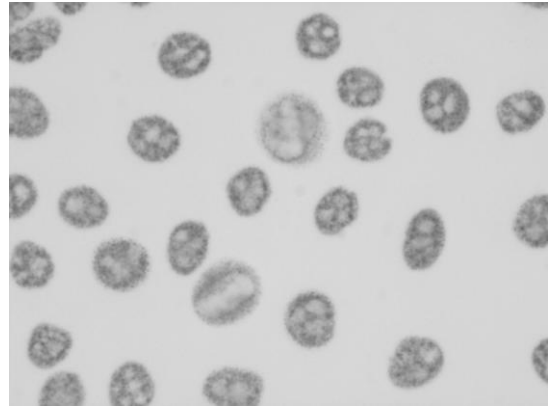
Assoziierte Erkrankung: Deutliches Indiz für CREST Syndrom, eine Variante der progressiven systemischen Sklerose (25).

[§]CREST ist eine Form von PSS, mit hervorragender Kalzinose, Raynaud'sches Phänomen, Ösophagus-Dysfunktion, Sklerodaktylie und Teleangiektasie.

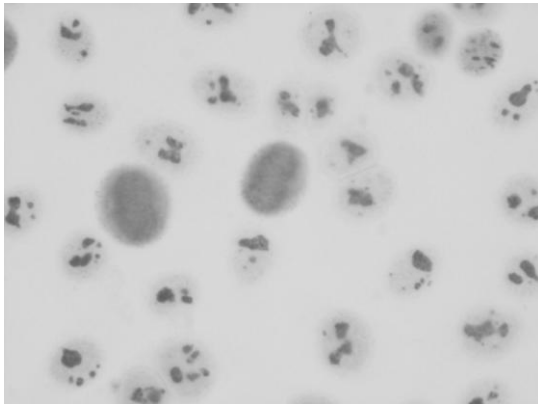
GRUNDLEGENDE VERFÄRBUNG MUSTER



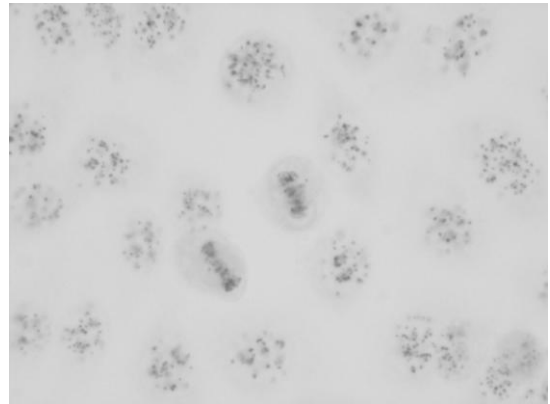
Homogene



Gesprenkelte



Nukleoläre



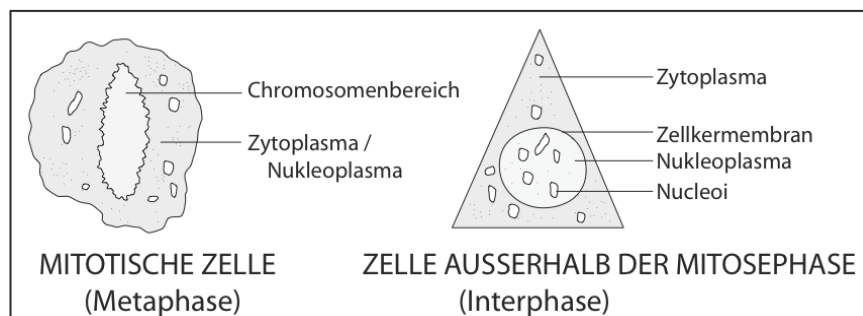
Zentromer

MITOTISCHE ZELLEN

NACHWEIS

Mitotische Zellen sollten bei 200-facher Vergrößerung oder niedriger in jedem Feld zu sehen sein. Zur Überprüfung, ob eine Zelle sich in Mitose befindet, ist eine 400-fache Vergrößerung notwendig. Mitotische Zellen zeigen eine charakteristische runde Zellform ohne sichtbare Zellkernmembran. Der Chromosombereich mitotischer Zellen weist, wegen der fehlenden Zellkernmembran, im Allgemeinen eine unregelmäßige Form innerhalb der Zelle sowie eine extreme Zusammenschnürung der Chromosomen auf.

Seren, die für DNA und/oder DNP und/oder Histon positiv sind (wie etwa die homogene Positivkontrolle von Immuno Concepts) weisen eine helle Verfärbung der Zellen im Chromosombereich auf. Bei Proben, die für DNA und/oder DNP und/oder Histon negativ sind (wie etwa die gefleckte Positivkontrolle von Immuno Concepts), weisen die mitotischen Zellen keine Verfärbung im Chromosombereich auf und sind u.U. schwer zu erkennen.



VERWENDUNG MITOTISCHER ZELLEN

Unterscheidung von gefleckten vs. homogenen Antikörpern: Feine Fleckenstrukturen sind u.U. schwer von homogenen Verfärbungen zu unterscheiden. Kennzeichen einer homogenen Struktur ist eine durchgehende Verfärbung der Chromosomen mitotischer Zellen. Zeigt das Muster deutliche Fleckenbildung, dann weist der Bereich außerhalb der Chromosomen eine zarte Fleckenreaktion auf.

HINWEIS: Wenn die gesamte mitotische Zelle eine feine Fleckenbildung und der Chromosombereich eine durchgehende Verfärbung aufweisen, dann sind höchstwahrscheinlich zwei oder mehr Antikörper vorhanden. Die Screening-Verdünnung ist als gefleckt/homogen zu werten und jeder Antikörper ist zum Endpunkt zu titrieren.

Periphere vs. Kernmembran-Antikörper: Antikörper, die ein peripheres Muster aufweisen, werden im Allgemeinen mit DNA/DNP nukleären Antigenen assoziiert. Hohe Titrierungen dieser Antikörper lassen auf SLE schließen. In Substraten, die keine mitotischen Zellen enthalten, ist das periphere Muster u.U. schwer von Kernmembran-Antikörpern zu unterscheiden. Wenn die mitotischen Zellen von Immuno Concepts verwendet werden, sind diese Muster zu unterscheiden, da der Chromosombereich der mitotischen Zellen eine intensive periphere Verfärbung aufweist, es tritt jedoch keine Verfärbung durch Zellkernmembran-Antikörper ein. Diese Unterscheidung ist klinisch sehr wichtig, da Zellkernmembran-Antikörper keine DNA-/DNP-Spezifität aufweisen und nicht mit SLE assoziiert werden (34).

Anti-Zentromer-Antikörper (ACA) vs. atypisch gefleckte, Zentromer-ähnliche Antikörper: Um auf Anti-Zentromer-Antikörper zu kontrollieren, sollte der Chromosombereich der mitotischen Zellen eine helle Verfärbung mit diskreten Flecken aufweisen. Tritt im Chromosombereich keine Fleckenbildung auf, dann weist der Antikörper keine Kinetochor-Spezifität auf und ist auch nicht mit der CREST Variante von Sklerodermie zu assoziieren (35). Tritt im Chromosombereich keine Fleckenbildung auf, dann ist der Antikörper nicht anti-zentromer und sollte auch nicht als „atypisch gefleckt“ gewertet werden.

ZYTOPLASMA-VERFÄRBUNG

Auch wenn Autoantikörper gegen Zytoplasma-Antigene im Allgemeinen nicht mit Bindegewebskrankheit assoziiert werden, können diese Antikörper mithilfe von Epithel-Zellkultursubstraten nachgewiesen werden (36). Mitochondrien- und gleichmäßige Muskel-Antikörper sind die beiden am häufigsten nachgewiesenen Antikörper und werden im Allgemeinen mit Mononukleose, chronischer aktiver Hepatitis und Lebererkrankung assoziiert (37- 38). Mithilfe des HEp-2 Zellsubstrats konnten gleichmäßige Muskel-Antikörper auch in Patienten mit Warzen nachgewiesen werden (39).

Anti-Mitochondrien-Antikörper (AMA): Diskrete Flecken, im perinukleären Bereich der Zelle konzentriert sowie in niedrigerer Dichte auf die Außenbereiche des Zytoplasma verteilt. Diese sind von Anti-Golgi Antikörpern zu unterscheiden, welche im Allgemeinen nur auf einer Seite des perinukleären Bereichs Flecken bilden, sowie von Anti-Ribosomen-Antikörpern, welche feinere Flecken mit einem strangartigen Erscheinungsbild aufweisen, das mit dem Standort des endoplasmischen Retikulums innerhalb der Zelle konsistent ist.

HINWEIS: Perinukleäre Flecken sind am leichtesten von peripheren nukleären Flecken zu unterscheiden, wenn berücksichtigt wird, dass die Mitochondrien eine ungleichmäßig gefleckte Verfärbung an der Außenseite der Zellkernmembran bilden, während periphere Seren durch eine durchgängige, gleichmäßige Verfärbung in der Zellkernmembran gekennzeichnet sind.

SEREN SIND ALS NEGATIV FÜR ANTINUKLEÄRE ANTIKÖRPER ZU WERTEN UND FÜR ANTIMITOCHONDRIEN-ANTI-KÖRPER POSITIVE SEREN SIND AUF AMA-SPEZIFISCHEN SUBSTRATEN ZU PRÜFEN.

Anti-gleichmäßige Muskel-Antikörper (ASMA): Sehr feine fibröse Verfärbungen der Zellen über das ganze Zytoplasma mit „Spinnweb“-ähnlichem Aussehen. Im Gegensatz zu Mitochondrien-Antikörpern, sind Verfärbungen von gleichmäßigen Muskel-Antikörpern gleichmäßig über das ganze Zytoplasma verteilt und können sich über den Nukleus hinaus ausdehnen. Mitotische Zellen weisen im Allgemeinen große diskrete Flecken außerhalb des Chromosombereichs auf. Gleichmäßige Muskel-Antikörper haben erwiesenermaßen eine hohe Spezifität mit Aktin (40-41).

SEREN SIND ALS NEGATIV FÜR ANTINUKLEÄRE ANTIKÖRPER ZU WERTEN UND FÜR ANTI-SMOOTH MUSKEL-ANTI-KÖRPER POSITIVE SEREN SIND AUF ASMA-SPEZIFISCHEN SUBSTRATEN ZU PRÜFEN.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

1. Es ist nicht möglich, lediglich auf der Basis des Nachweises antinukleärer Antikörper eine Diagnose zu stellen. Der Arzt muss die Ergebnisse im Zusammenhang mit Krankengeschichte und Symptomen des Patienten, den Ergebnissen der körperlichen Untersuchung und anderen diagnostischen Methoden interpretieren.

2. Lediglich auf Grund eines positiven Testergebnisses für antinukleäre Antikörper mit diesem Test sollte keine Behandlung initiiert werden. Für eine Behandlung müssen auch klinische Symptome, andere Laborergebnisse und der Gesamteindruck des Patienten auf den behandelnden Arzt herangezogen werden.
3. Einige Medikamente, darunter Procainamid und Hydralazin, können eine Lupus erythematosus-ähnliche Erkrankung induzieren (42). Patienten mit medikamenteninduziertem LE können u.U. positiv homogene oder homogen/periphere ANA aufweisen, die direkt gegen nukleäre Histone gerichtet sind (43).
4. Bei einem kleinen Prozentsatz der Patienten mit SLE sind durch indirekte Immunoenzyme u.U. keine ANA nachweisbar, sie können jedoch mithilfe anderer Techniken nachgewiesen werden (44).
5. Es ist nicht erforderlich, den Titerendpunkt zu bestimmen. Jeder ANA-Titer größer oder gleich 1: 640 gilt als hoher Titer und weist den Kliniker auf die Notwendigkeit zusätzlicher Tests hin. Jedes Labor sollte sein eigenes Titerschema etablieren, basierend auf den Antikörpern die in der Patientenpopulation nachgewiesen werden. Die Durchführung einer Endpunkt Titration zeigt jedoch alle in der Probe enthaltenen Muster welche oft maskiert werden und vermeidet damit Diskrepanzen zu den Folgetests. Auch wenn ein hoch-titriertes ANA als starkes Indiz für Bindegewebskrankheit zu sehen ist, ist der diagnostische Wert gering. Das Ergebnis sollte vielmehr in Zusammenhang mit dem klinischen Gesamtprofil des Patienten bewertet werden.
6. Die Muster von Verfärbungen ändern sich oft mit fortschreitender Titrierung der Seren. Dieses Phänomen ist in der Regel auf das Vorhandensein von mehr als einem Antikörper zurückzuführen.
7. Bei einem geringen Prozentsatz von Patienten mit infektiösen und/oder neoplastischen Krankheiten sind auch positive ANA sichtbar (9).

ZU ERWARTENDE WERTE

Die folgenden Daten wurden im Verlauf von zwei Jahren in einem medizinischen Zentrum einer großen Universität mithilfe eines HEp-2 ANA Zellsubstrats erstellt (45). Tabelle 1.

TABELLE 1

Diagnose	Muster Segregation	% positiv
Anormale Population (über 4.500 Seren getestet):		
Systemischer Lupus erythematosus	S, P+H, H, P	93
Rheumatoide Arthritis	S, H	40
Gemischte Bindegewebskrankheit	S	99
Progressive systemische Sklerose-diffus	S, N	85
Progressive systemische Sklerose-CREST	ACA	93
Juvenile rheumatoide Arthritis		
Systemisch	S	14
Polyartikulär	S	13
Pauciartikulär-B27+	-	0
DM/PM	S	25
Vaskulitis	S	20
Normale Population (über 9.000 Seren getestet):		
20-60 Jahre	S	2
70-80 Jahre	S	3,5

Abkürzungen: S=Gefleckt, H=Homogen, P=Peripher, N=Nucleolar, ACA=anti-Zentromer

LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES TESTS

In einer vergleichenden Studie wurde gezeigt, dass das Immuno Concepts Colorzyme® ANA-Testsystem äquivalent zum indirekten Immunofluoreszenz-ANA-Test von Immuno Concepts ist. Auf beiden Systemen wurden fünfzig Serumproben einem Screening unterzogen und titriert. Diese Proben beinhaltenen Autoantikörper, die im Allgemeinen in HEp-2 Substrat nachgewiesen werden, ungewöhnliche und atypische Muster sowie Negativseren im Grenzbereich. Die Enzym-Resultate korrelierten zu 98 % mit denen der Immunofluoreszenz-ANA-Tests von Immuno Concepts bei allen getesteten Seren, die positiv oder negativ waren oder ein gemischtes Muster aufwiesen (45).

Das Immuno Concepts Fluoreszenz-ANA-Testsystem wurde zuvor im Vergleich mit zwei anderen im Handel erhältlichen Fluoreszenz-Antikörpertests evaluiert (45). Im Rahmen der Studie wurden 97 Serumproben von normalen Personen untersucht sowie u.a. von folgenden Diagnosen: systemischer Lupus erythematosus (SLE), gemischte Bindegewebskrankheit (MCTD), Raynaud'sche progressive systemische Sklerose – CREST Variante (PSS-CREST), rheumatoide Arthritis (RA), juvenile rheumatoide Arthritis (JRA) und anderen Bindegewebskrankheiten. Die Seren wurden mit den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Screening-Verdünnungen getestet. Die Ergebnisse der Studie sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

TABELLE 2

DIAGNOSE	Zahl der Patienten	Immuno Concepts Positive 1:40	ZB Zelle Positive 1:20	Maus Niere Positive 1:20
SLE	23	23	22	21
MCTD/Überlappung	7	7	6	4
Raynaud'sche PSS-CREST	17	17	16	7
RA	2	2	2	0
JRA	4	4	4	3
Andere gemischte Bindegewebskrankheit	9	9	9	6
Hospitalisierte Kontrollen	11	7	3	2
Normale Kontrollen	24	1	1	0

Patienten, die in der Substrat-Kategorie „andere Bindegewebskrankheiten“ von Immuno Concepts positiv waren, hatten temporäre Arthritis (1), undifferenzierte Bindegewebskrankheit (1), Polymyositis (2), Monoarthritis (2), Polyarthritis (3) sowie weitere nicht klassifizierbare Krankheiten.









Die hospitalisierten Kontrollen mit positiven ANA auf dem Immuno Concepts Substrat hatten Diabetes (2), unklassifizierbare Arthritis (3), Hypothyroidismus (1) sowie Immunkomplex-Nierenerkrankung (1), welche die Kriterien für die Diagnose von SLE nicht erfüllte.

BIBLIOGRAPHIE

- 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.
- Barnett, E.V. Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. *California Medicine* 104:463-469, 1966.
- Casals, S.P., Friou, G. J., Myers, L. L. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 7:379-390, 1964.
- 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.
- Mathy, J. P., Baum, R., Toh, B. H. Autoantibody to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 41:73-80, 1980.
- 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.
- 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.
- Nakamura, R.M., Tan, E.M. Recent Progress in the Study of Autoantibodies to Nuclear Antigens. *Hum. Pathol.* 9:85-91, 1978.
- Fernandez-Madrid, F., Mattioli, M. Antinuclear Antibodies (ANA): Immunologic and Clinical Significance. *Semin. Arthritis Rheum.* 6:83-124, 1976.
- Burnham, T.K., Bank, P. W. Antinuclear Autoantibodies 1. Patterns of Nuclear Immunofluorescence. *J. Invest. Dermatol.* 62:526-534, 1974.
- 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.
- 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.
- Cohen, M. L., Dawkins, B., Dawkins, R. L., et al. Clinical Significance of Antibodies to Ribonucleoprotein. *Ann. Rheum. Dis.* 38:74-78, 1979.
- 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.
- 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.
- Alspaugh, M. A., Tan, E. M. Antibodies to Cellular Antigens in Sjögren's Syndrome. *J. Clin. Invest.* 55:1067-1073, 1975.
- 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.
- Wolfe, J. F., Adelstein, E., Sharp, G. C. Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis. *J. Clin. Invest.* 59:176-178, 1977.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hahon, N., Eckert, H. L., Stewart, J. Evaluation of Cellular Substrates for Antinuclear Antibody Determinations. *J. Clin. Microbiol.* 2:42-45, 1975.
- 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.
- Tan, E.M., Rodnan, G. P., Garcia, I., et al. Diversity of Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 23:617-625, 1980.
- Miyachi, K., Fritzler, M. J., Tan, E.M. Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. *J. Immuno.* 121:2228-2234, 1978.
- 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.
- 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.
- Peter, V.B., Dawkins, R. L. Evaluating Autoimmune Diseases. *Diagnostic Medicine.* Sept. - Oct. 1979.
- Weller, T.H., Coons, A.H. Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:789-794, 1954.
- Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. *Ann. Int. Med.* 83:464-469, 1975.
- McDuffie, F. C., Burch, T.N. Immunologic Tests in the Diagnosis of Rheumatic Diseases. *Bull. Rheum. Dis.* 27:900-911, 1976.
- von Mühlen, C. A., Tan, E. M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. *Sem. in Arthritis and Rheum.* 24:323-358, 1995.
- 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.
- Fritzler, M. J., Valencia, D.W., McCarty, G.A. Speckled Pattern Antinuclear Antibodies Resembling Anticentromere Antibodies. *Arthritis Rheum.* 27:92-96, 1984.
- Gabbiani, G., Ryan, G.B., Lamelin, J.P., et al. Human Smooth Muscle Antibody. *Am. J. Pathol.* 72:473-488, 1973.

37. 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.
38. Klatskin, G., Kantor, F.S. Mitochondrial Antibody in Primary Biliary Cirrhosis and Other Diseases. Ann. Int. Med. 77:553-541, 1972.
39. McMillan, S.A., Haire, M. Smooth Muscle Antibody in Patients with Warts. Clin. Exp. Immunol. 21:339-344, 1975.
40. Anderson, P., Small, J.V., Sobieszek, A. Studies on the Specificity of Smooth Muscle Antibodies. Clin Exp. Immunol. 26:57-66, 1976.
41. 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.
42. Lee, S.L., Rivero, I., Siegel, M. Activation of Systemic Lupus Erythematosus by Drugs. Arch. Int. Med 117:620-626, 1966.
43. Fritzler, M.J., Tan, E.M. Antibodies to Histones in Drug-Induced and Idiopathic Lupus Erythematosus. J. Clin. Invest. 62:560-567, 1978.
44. Gladman, D.D., Chalmers, A., Urowitz, M.B. Systemic Lupus Erythematosus with Negative LE Cells and Antinuclear Factors. J. Rheum. 5:142-147, 1978.
45. Data on file at Immuno Concepts.

Im Falle der Beschädigung der Schutzverpackung treten Sie vor Gebrauch bitte mit Immuno Concepts in Verbindung.

	Hersteller		Autorisierter Repräsentant in der Europäischen Gemeinschaft
	Temperatur-Beschränkung		Enthält genügendes für <n> Tests
	Beachten Sie die Anwendungsvorschriften		In vitro Medizinische Diagnoseeinheit
	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-I, 4.11.02.003.090-De Rev 3.2 © Copyright 2020

ANA COLORZYME®-TESTVERFAHREN

Hinweis: Wenn das Labor ein automatisches Pipettiersystem benutzt, müssen die Verfahrensweisen und die Empfehlungen des Herstellers befolgt werden. Das Pipettiersystem muss für die verwendeten Verdünungen, Abgabevolumen und Inkubationszeiten, wie unten beschrieben, programmiert werden.

- 1. PUFFER REKONSTITUIEREN (PBS)**
Inhalt eines Pufferbeutels in einem Liter deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Die PBS-Waschpufferlösung kann verschlossen und gekühlt bei 2-25°C bis zu vier Wochen aufbewahrt werden.
- 2. FARBREAGENS REKONSTITUIEREN**
Inhalt eines Beutels mit 150 ml deionisiertem oder destilliertem Wasser auflösen. Gut durchmischen, bis das Pulver völlig aufgelöst ist. Dieses Farbregens ist 30 Tage stabil, wenn es bei Raumtemperatur in einem geschlossenen Behälter aufbewahrt wird. Dieses Farbregens kann bis zu 30 Tage lang, oder bis eine Farbänderung oder Ausfällung zu beobachten ist, wiederverwendet werden. Trübungen oder Schimmern bei Wiederverwendung, ohne sichtbare Ausfällungen, sind normal. Je nach Gebrauchshäufigkeit können 150 ml Colorzyme® Farbregens mit bis zu 20 Objektträgern verwendet werden.
- 3. PATIENTENPROBEN VERDÜNNEN**
Screening: Patientenproben 1:40 verdünnen, indem 0,05 ml (50 µl) Serum zu 1,95 ml rekonstituiertem PBS zugegeben werden. Semiquantitative Titrierung: Für die weitere Titrierung Reihenverdünnungen der Serumprobe (z. B. 1:80, 1:160, 1:320...usw.) unter Verwendung von PBS herstellen.
- 4. SUBSTRATTRÄGER VORBEREITEN (20-25 µl/Vertiefung)**
Objektträger aus der Folie entnehmen und Kontrollseren wie folgt in den Kontrollvertiefungen platzieren: Tropfflasche mit Kontrollserum umdrehen und vorsichtig drücken, bis an der Spitze ein Tropfen austritt. Den Tropfen vorsichtig in die entsprechende Kontrollvertiefung geben, dabei direkten Kontakt der Tropferspitze mit der Oberfläche des Objektträgers vermeiden. 1 Tropfen (20-25 µl) Patientenprobe in die nummerierten Vertiefungen geben.
HINWEIS: Für allgemeine Screening-Verfahren wird die homogene Positivkontrolle empfohlen. Für die semiquantitative Titrierung wählen Sie die Positivkontrolle aus, deren Verfärbungsmuster die meiste Ähnlichkeit mit der Screening-Probe hat (z.B. ist für Patientenproben, die beim Screening eine fleckige Verfärbung ergeben, eine gefleckte Positivkontrolle zu verwenden).
ACHTUNG: DIREKTER KONTAKT DER TROPFERSPITZE MIT DEM OBJEKTTRÄGER KANN DAS ANTIGEN-SUBSTRAT BESCHÄDIGEN.
- 5. OBJEKTTRÄGER INKUBIEREN (30 ± 5 Minuten bei Zimmertemperatur, d.h. 18-25°C)**
Objektträger in eine feuchte, bedeckte Schale legen (z. B. Petrischale mit angefeuchtetem Papierhandtuch). 30 Minuten (± 5 Minuten) bei Zimmertemperatur (18-25°C) abgedeckt inkubieren lassen.
- 6. PBS-SPÜLUNG**
Objektträger aus der Inkubationsschale nehmen und mit Spritzflasche, Pasteur- oder serologischer Pipette kurz mit PBS spülen. Den Puffer nicht direkt in die Vertiefungen einspritzen.
HINWEIS: Um bei Objektträgern eine Kreuzkontamination zu vermeiden, den PBS auf die Mittellinie des Objektträgers spritzen, dabei den Träger zuerst in Richtung der oberen Vertiefungen neigen, anschließend in Richtung der unteren Vertiefungen.
- 7. PBS-WASCHGANG (10 Minuten)**
Objektträger in einem entsprechenden Gefäß 10 Minuten mit PBS waschen (Glaszylinder, Schale). Der Waschvorgang kann ohne Auswirkung auf die Testergebnisse auf 10-30 Minuten ausgedehnt werden. PBS-Waschlösung nach Gebrauch entsorgen.
- 8. ENZYM-ANTIKÖRPER-REAGENS (Vertiefungen mit 12-14 Tropfen bedecken)**
Jeweils einen Objektträger aus dem PBS-Puffer nehmen und 3-5 Mal in deionisiertes oder destilliertes Wasser tauchen. Überschüssiges Wasser durch seitliches Ausklopfen auf Saugpapier oder Papierhandtuch entfernen. Objektträger sofort wieder in die Inkubationskammer geben und die Vertiefungen vollständig mit Enzym-Antikörperreagens füllen; beginnend mit einem Tropfen pro Vertiefung. Vorgang für alle Objektträger wiederholen. Das Enzym-Antikörperreagens wurde titriert, um das auf dem Objektträger verbliebene deionisierte oder destillierte Wasser zu kompensieren.
HINWEIS: Es ist wichtig, dass die Vertiefungen auf dem Objektträger während dieses Vorgangs nicht austrocknen, andernfalls kann das Substrat beschädigt werden.
DEN OBJEKTTRÄGER NICHT TROCKEN TUPFEN ODER WISCHEN, ODER LÄNGER ALS 15 SEKUNDEN OHNE ENZYM-ANTIKÖRPERREAGENS STEHEN LASSEN.
- 9. OBJEKTTRÄGER INKUBIEREN (30 ± 5 Minuten bei Zimmertemperatur, d.h. 18-25°C)**
Deckel in eine Inkubationsschale legen und Objektträger 30 Minuten (± 5 Minuten) bei Zimmertemperatur (18-25°C) inkubieren lassen.
- 10. PBS-SPÜLUNG**
Objektträger aus der Inkubationsschale nehmen und kurz mit PBS spülen. Den Puffer nicht direkt in die Vertiefungen einspritzen.
- 11. PBS-WASCHGANG (10 Minuten)**
Objektträger in einem entsprechenden Gefäß 10 Minuten mit PBS waschen (Glaszylinder, Schale). Der Waschvorgang kann ohne Auswirkung auf die Testergebnisse auf 10-30 Minuten ausgedehnt werden.
- 12. FARBREAGENS INKUBIEREN (30 Minuten bei Zimmertemperatur, 18-25°C)**
Jeweils einen Objektträger aus dem PBS entnehmen, 3-5 Mal in deionisiertes oder destilliertes Wasser tauchen und Objektträger seitlich auf Saugpapier oder Papierhandtuch ausklopfen, um verbliebenes Wasser zu entfernen. Objektträger sofort in einen Coplin-Glaszylinder mit aktiviertem Farbregens einlegen und 30 Minuten inkubieren.
- 13. PBS-SPÜLUNG**
Jeweils einen Objektträger aus dem Coplin-Glaszylinder nehmen und auf allen Seiten 4-5 Sekunden lang mit PBS spülen. Den Puffer nicht direkt in die Vertiefungen einspritzen. Jeden mit PBS gespülten Objektträger in einen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser gefüllten Coplin-Glaszylinder einlegen, bis alle Objektträger aus dem Farbregens entfernt sind. Sofort mit Schritt 14 weiter machen.
- 14. DECKGLAS AUFSETZEN**
Jeweils einen Objektträger aus dem destillierten oder deionisierten Wasser nehmen und Objektträger auf Saugpapier oder Papierhandtuch ausgebreitet seitlich ausklopfen, um verbliebenes Wasser zu entfernen. **DEN OBJEKTTRÄGER NICHT TROCKEN TUPFEN ODER WISCHEN, ODER LÄNGER ALS 15 SEKUNDEN OHNE DECKGLAS STEHEN LASSEN.** 4-5 Tropfen semipermanentes Montagemedium entlang der Mittellinie jedes Objektträgers hinzugeben. Deckglas vorsichtig in Position bringen; dabei Luftpneinschlüsse vermeiden; hierzu das Deckglas vorsichtig an einem Ende des Objektträgers aufsetzen und auf das andere Ende herablassen.
HINWEIS: Überschüssiges Montagemedium auf dem Objektträger kann wegen der Lichtstreuung oder wegen ungenügender Auflösung der Zellen (verschwommenes Bild) zu einem hohen Fluoreszenz-Hintergrund führen. Überschüssiges Montagemedium kann vom Objektträger entfernt werden, indem das Deckglas mit Saugpapier abgetupft wird, ohne es dabei zu bewegen.

TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG: +1-916-363-2649
oder via E-Mail: technicalsupport@immunoconcepts.com

