

COLORZYME® ANA TESTSYSTEM

För diagnostisk användning in vitro
För yrkesmässigt bruk

AVSEDD ANVÄNDNING: Det här är ett indirekt enzymantikroppstest för halvkvantitativ detektion av antinukleär antikropp i humanserum. 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 dessa autoantikroppar visar med hjälp av immunofluorescerande teknik ett litet antal nukleärproteinspecificiteter (1). Tack vare det höga sambandet mellan positiv ANA och systemisk lupus erytematosus (SLE) utesluter negativ ANA i stort sett 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 har 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). Tack vare dessa sjukdomsassociationer är ANA-testning nu blivit etablerat som screeningmetod 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). Immuno Concepts Colorzyme® ANA testsystem med mitotiska* humanepiteloidceller (HEp-2) är ett av de mest avancerade systemen för detektion av ANA. HEp-2-celler med mitotiska former har visat sig ha större känslighet och ger skarpare mönsterigenkänning än klassiskt musnjuresubstrat när det gäller detektion av antikroppar vid progressiv systemisk skleros (PSS) (25). Mitotiska former underlättar igenkännandet av olika mönster och detektion av tidigare orapporterade nukleära antigener, vilka förekommer i högre koncentrationer i mitotiskt aktiva celler (26-28).

TESTPRINCIP

Immuno Concepts Colorzyme® ANA testsystem är en indirekt enzymantikroppsmetod. Patientprover inkuberas med antigensubstrat för att tillåta specifik bindning av autoantikroppar till cellkärnorna. Om ANA förekommer bildas ett stabilt antigen/antikroppkomplex. Efter tvättning för att avlägsna obundna antikroppar odlas substratet med en antihuman antikroppreagens konjugerad med pepparrotsperoxidas. Om resultatet är positivt, bildas ett stabilt komplex i tre delar bestående av en enzymantikropp bunden till en human antinukleär antikropp, som i sin tur är bunden till en nukleär antigen.

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

Detta komplex kan visualiseras genom att objektglaset odlas i en färgreagens som innehåller ett enzymspecifikt substrat. Reaktionen mellan den enzymmärkta antikroppen och det specifika substratet leder till en färgreaktion på objektglaset, vilket kan ses i standardljusmikroskop. I positiva prover har cellkärnorna en mörkblå/lila färgning med ett mönster som är karaktäristiskt för den aktuella nukleära antigendistributionen inom cellerna. Om provet är ANA-negativt, uppvisar cellkärnan inte något 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 färgreagensen som måste lösas upp i avjoniserat eller destillerat vatten före användning).

Förvaring: Alla komponenter kan förvaras i kylskåp i 2-10°C. Efter rekonstitution skall PBS-buffertreagensen förvaras i skruvlockbehållare och lagras mellan 2-25°C. Efter rekonstitution skall Colorzyme® färgreagensen lagras i en sluten behållare i rumstemperatur i högst 30 dagar. Beroende på hur ofta den används kan 150 ml Colorzyme® färgreagens användas med maximalt tjugo objektglas.

Stabilitet: Alla komponenter är stabila i minst tolv månader från tillverkningsdatum. Använd inte komponenterna efter utgångsdatum.

REAKTIVA REAGENSER

Objektglas för substrat [SLIDE]: ANA-objektglas för substrat som använder HEp-2-celler (med mitotiska former) som odlats och stabiliserats direkt på testbrunnarna. Ett unikt vallgravsformat objektglas minimerar korskontamination mellan brunnarna under analysen. Objektglaspåsen är fylld med en stabil giftfri gas som bidrar till cellernas stabilitet.

Homogen positiv kontroll [CONTROL|+]: Katalognr 2021. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml positivt humankontrollserum med antikropp som är specifik för DNA och/eller DNP-nukleära antigener. Serumet uppvisar en homogen färgreaktion med Immuno Concepts HEp-2-cellsubstrat. Kromosomområdet i de mitotiska cellerna 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. Serumet uppvisar en av de mest vanliga fläckiga färgreaktioner som setts med Immuno Concepts HEp-2-cellsubstrat. Kromosomområdet i de mitotiska cellerna 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. Serumet uppvisar en nukleolär färgreaktion med Immuno Concepts HEp-2-cellsubstrat.

Centromer positiv kontroll [CONTROL|+]: Katalognr 2025. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml positivt humankontrollserum med antikropp som är specifik för kromosomala centromerer (kinetochore). Serumet uppvisar en åtskiljd fläckig färgreaktion med Immuno Concepts HEp-2-cellsubstrat. De mitotiska cellernas kromosomområde uppvisar samma åtskiljda fläckiga färgreaktion.

Titrerbart kontrollserum [TC]: Katalognr 2026. Bruksfärdig ampull innehållande 0,5 ml positivt humankontrollserum som skall behandlas som ett utspätt patientprov. Se ampullens etikett för information om antikroppnivåvärde.

Negativt kontrollserum [CONTROL|-]: Katalognr 2031. Bruksfärdig pipettampull innehållande 1,0 ml negativt humankontrollserum. Även om det negativa kontrollserumet kan uppvisa svag fluorescens av cytoplasmat med ljusare färgning av den mitotiska cellens icke-kromosomområde, uppvisar det inget urskiljningsbart nukleärt färgningsmönster.

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

Färgreagens [PWDR|CRP]: Katalog nr 4066. HRP-specifikt enzymsubstratpulver som innehåller 4-kloro-1-naftol. Varje förpackning innehåller pulver för att framställa 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 stängd behållare. Färgreagensen kan återanvändas i maximalt 30 dagar, eller tills det syns någon färgförändring eller fällning. Grumlighet 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 buffertpulver levereras för vart femte objektglas i kompletta testsatser).

Framställning: 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)
Stängd behållare för förvaring av Colorzyme® färgreagens
Avjoniserat eller destillerat vatten
Provrör för att framställa serumspädningar
Läskapper eller pappershanddukar
Inkubationskammare
Engånghandskar
Laborietidur
Lätt mikroskop (standardutförande) med 200 och 400 gångers förstöringskapacitet

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. Allt material av humant ursprung som använts i den här produkten 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 yntigen (HBsAg). Ingen testmetod kan emellertid helt garantera att det inte förekommer 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 potentiellt smittsamt humanserum eller blodprov i Centrum för Sjukdomskontroll/Nationella hälsoinstitutets manual: *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 motsägelsefulla resultat.
4. Natriumazid (0,09%) används som konserveringsmedel. Natriumazid kan reagera med ledningsrör av bly eller koppar och bilda explosiva metallazidsalter. När reagenser kasseras, skall man spola med rikliga mängder kranvatten för att skölja bort eventuella rester i avloppsledningarna. Natriumazid är ett gift och kan vara toxiskt vid förtäring.
5. Denna sats är avsedd för *in vitro*-diagnostiskt bruk.
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 användning vid övervakning av reproducerbarheten mellan olika loter och serier. Det är inte avsett för mätning av den totala sensitiviteten eller analysens specificitet.
8. Undvik a röka, äta eller dricka i områden där prover eller satsreagenser hanteras.
9. Undvik alltid stänk och alstring av aerosoler.
10. Andra inkubationstider och temperaturer än de angivna kan ge felaktiga resultat.
11. Korskontamination mellan reagenser och prover kan ge felaktiga resultat.

12. Återanvändningsbart glas måste tvättas och noggrant sköljas från rengöringsmedel innan det används. 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 av reagenser eller prover kan ge felaktiga resultat.
16. Pipettera aldrig med munnen och undvik att komma i kontakt med reagenser och prover med hud eller slemhinnor. Tvätta med bakteriedödande tvål och rikligt med vatten om sådan kontakt inträffat.
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 substanser: 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 analys.

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.

VARNING: 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 av 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 klart urskiljningsbart nukleärt färgningsmönster. PBS-kontrollen används för att observera ospecifik färgning av enzymantikroppreagensen och bör inte uppvisa blå färgning. Om kontrollerna inte ser ut enligt beskrivningarna är testet ogiltigt och bör göras om.

TILLHÖRANDE TITRERBAR KONTROLL

Vid avläsning av antikroppnivåerna börjar många laboratorier med att avläsa 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 metod för att fastställa antikroppnivåns ändpunkter.

Antikroppnivåns medelvärde och spridningsområde (\pm en spädning på var 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 bedöma reproducerbarheten (precisionen) från serie till serie.

Genom att utföra flera analyser av denna titrerbara kontroll med Immuno Concepts Colorzyme® ANA-testsystem har ett medelantikroppvärde fastställts för varje lotnummer. Lotnumret och antikroppnivåns medelvärde och spridningsområde (\pm en dubbel spädning på vardera sidan om medelvärdet) står angivna på flaskans etikett och skall användas som vägledning för testsystemets prestanda.

Det är viktigt att man inte blandar ihop färgningens intensitet med eventuell förekomst eller frånvaro av antinukleära antikroppar. Den viktigaste faktorn vid bedömningen av om en viss serumspädning är positiv eller inte är om det finns 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 eller NSp I (flera åtskilda fläckar i interfascellkärnan), men detta är det typiska fläckmönster som skall användas för att avläsa ändpunkter.

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

1. Korrekt placering av mikroskopljusets bana. Se bruksanvisningen till mikroskopet för mer information.
2. Objektivets numeriska bländaröppning. Den numeriska bländaröppningen är förknippad med ljusinsamlingsförmågan och objektivets upplösning. Detta värde står angivet på sidan av objektivet.
3. Precision och exakthet i spädningsteknik, utrustning och testmetodernas genomförande.

TOLKNING AV TESTRESULTATEN

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

Antikroppnivåer: Vid avläsning av antikroppnivåer börjar många laboratorier med att avläsa 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 antikroppnivåns ändpunkter. Det är viktigt att inte blanda ihop färgningens intensitet med närvaro respektive frånvaro av antinukleära antikroppar. Den viktigaste faktorn vid bedömning av om en viss serumspädning är positiv eller ej är om det finns ett klart urskiljningsbart nukleärt mönster, oavsett färgningens intensitet.

WARNING: En del sera kan uppvisa nukleär och cytoplasmisk färgning utan ett synbart nukleärt mönster. Detta fenomen beror i allmänhet på heterofila antikroppar och bör rapporteras som negativt (29).

ENZYM FÄRGNING

Färgningsgraden har inget bevisat kliniskt värde och endast begränsat värde som indikator på antikroppnivån (30). För att förenkla tolkningen skall screeningresultaten registreras som starkt positiva eller positiva och titreras därefter.

Starkt positiv reaktion: Mörk till mycket mörkblå färgning, klar cellkontur, skarpt definierat nukleärt mönster.

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

OBSERVERA: Eftersom cellerna odlas direkt på objektglasets yta befinner sig inte alla celler i samma skede i cellcykeln. Det är inte ovanligt att man ser olika grader av färgningsintensitet från cell till cell på grund av skillnaderna i koncentration och de olika antigenernas placering 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 kliniker 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 (31).

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

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 (31).

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 på färg.

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 SSB/La-antigen). Lägre antikroppnivåer kan tyda på annan bindvävssjukdom (32).

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 uppvisar 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 (33).

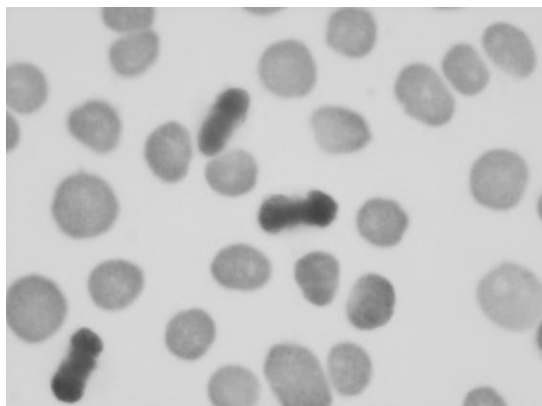
Centromer: Ett enstaka fläckigt färgmönster som i hög grad tyder på CREST[§]-syndromvarianten av progressiv systemisk skleros (25). De nukleära fläckarna är mycket åtskiljda och är vanligtvis någon multipel av 46 (oftast 23-46 fläckar per kärna). Eftersom centromerer är sammandragningar där spindelfibrer binds till kromosomerna, uppvisar de mitotiska cellerna samma fläckreaktion i kromosomområdet (12).

Synonymer: ACA, åtskiljt fläckig.

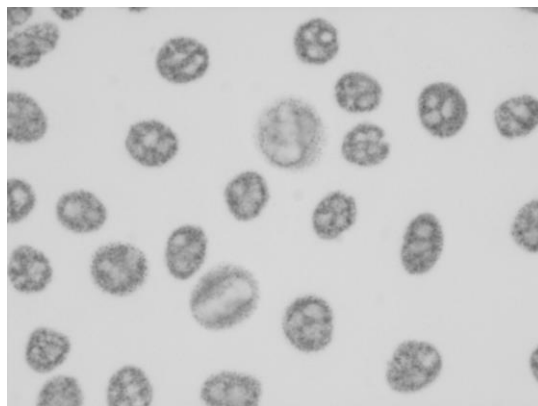
Nukleära antigener: Kromosom centromer (kinetochore).

Sjukdomssamband: Tyder i hög grad på CREST-syndromvarianten av progressiv systemisk skleros (25).

GRUNDFÄRGNINGSMÖNSTER

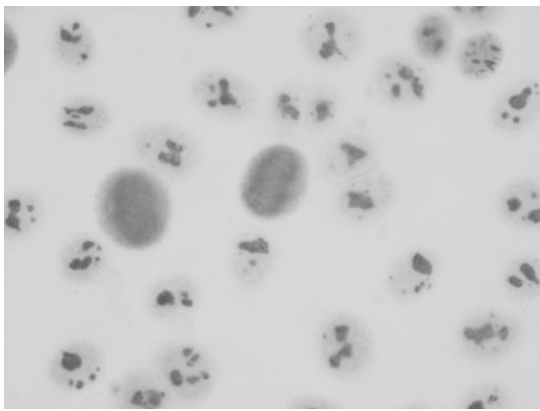


Homogent

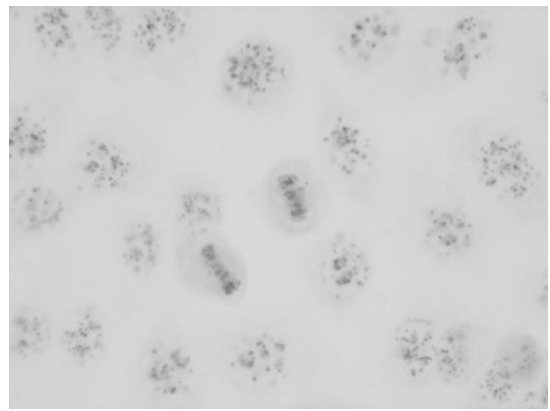


Fläckigt

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



Nukleolärt



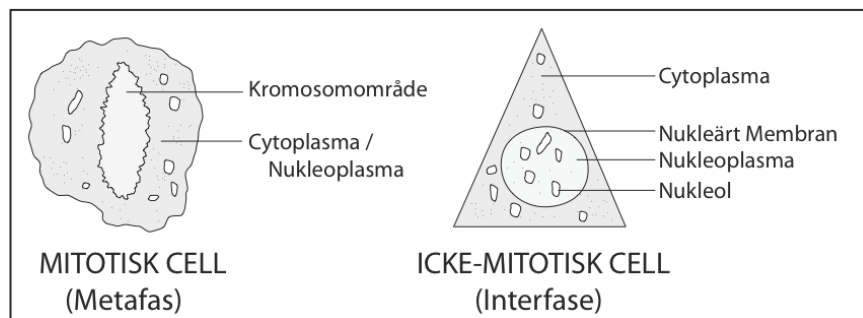
Centromert

MITOTISKA CELLER

DETEKTION

Mitotiska celler bör kunna synas i varje fält, när man granskar dem i minst 200 gångers förstoring. Studera cellen i 400 gångers förstoring för att verifiera att en cell befinner sig 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 prover som är negativa för DNA, DNP och/eller histon (t ex Immuno Concepts fläckiga positiva kontroll) uppvisar de mitotiska cellerna inte någon kromosomfärgning, och kan därför vara svåra att se.



ANVÄNDNING AV MITOTISKA CELLER

Detektion 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 dessa antikroppar tyder på SLE. I substrat som inte innehåller mitotiska celler kan det perifera mönstret vara svårt att skilja från en nukleär membranantikropp. Genom att använda Immuno Concepts mitotiska celler går det att urskilja dessa mönster, eftersom de mitotiska cellernas kromosomområde kommer att 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 (34).

Anti-centromer antikropp (ACA) kontra atypiskt färgad antikropp som liknar en centromer: För att kunna verifiera anticentromerantikroppen bör kromosomområdet i de mitotiska cellerna färgas ljust med åtskiljda fläckar. Om kromosomområdet inte färgas har antikroppen ingen kinetokorspecificitet eller association med sklerodermias CREST-variant (35). Om kromosomområdet inte färgas är antikroppen inte någon anticentromer och skall därför rapporteras som "atypiskt fläckig".

CYTOPLASMISK FÄRGNING

Även om autoantikroppar mot cytoplasmiska antigener inte vanligtvis associeras med bindvävssjukdom, kan sådana antikroppar detekteras genom epiteliäl cellstruktursubstrat (36). Mitokondriala och glatta muskelantikroppar är de två antikroppar som vanligtvis upptäcks och allmänt associeras med mononukleos, kroniskt aktiv hepatit och leversjukdom (37-38). Med hjälp av HEp-2-cellsstrat har den glatta muskelantikroppen även påvisats hos patienter med vårtor (39).

Antimitokondrial antikropp (AMA): Enstaka fläckar som är koncentrerade i cellens perinukleära område och utvidgade i lägre densitet i cytoplasmas 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 nätformigt utseende som överensstämmer med platsen för endoplasmisk retikulum i cellen.

OBSERVERA: Perinukleära fläckar kan enkelt åtskiljas 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 MED AMA-SPECIFIKT SUBSTRAT.

Antiglatt muskelantikropp (ASMA): Mycket fin fibrös färgning över hela cellcytoplasman med ett spindelvävsliknande utseende. Till skillnad från mitokondrisk antikropp är glatt muskelantikroppens färgning likformig över hela cytoplasman och kan även sträcka sig över kärnan. Mitotiska celler uppvisar i allmänhet stora, åtskiljda fläckar utanför kromosomområdet. Glatt muskelantikropp har visat sig ha en hög specificitet till aktin (40-41).

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. Läkaren måste tolka dessa resultat med hänsyn till patientens historia och symptom, de fysiska upptäckterna och andra diagnostiska metoder.
2. Behandling bör inte påbörjas enbart på grundval av ett positivt test för antinukleära antikroppar. Kliniska indikationer, andra laboratorieupptäckter och läkarens kliniska intryck måste beaktas innan eventuell behandling påbörjas.
3. Vissa läkemedel, bland annat procainamid och hydralazin, kan orsaka en lupus erytematos-liknande sjukdom (42). Patienter med läkemedelsinducerad LE kan uppvisa positiv homogen eller homogen/perifer ANA, som i allmänhet är riktad mot nukleära histoner (43).
4. En liten andel patienter med SLE uppvisar eventuellt inte ANA genom indirekt immunoenzym, men kan uppvisa ANA med andra metoder (44).
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 användas för diagnos, utan snarare ses som en del av patientens totala sjukdomshistoria.
6. Färgningsmönstren ändras ofta i och med fortlöpande titrering av sera. Detta beror i allmänhet på förekomsten av mer än en nukleär antikropp.
7. Positiva ANA kan även förekomma hos en liten andel patienter med smittsamma och/eller neoplastiska sjukdomar (9).

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

I ett stort medicincentrum på ett universitet framställdes följande data över en tvåårsperiod med hjälp av HEp-2-cell ANA-substrat (45). Tabell 1.

TABELL 1

Diagnos	Mönsterfördelning	% 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

En jämförande studie har visat att Immuno Concepts Colorzyme® ANA testsystem motsvarar Immuno Concepts indirekta immunofluorescerande ANA-test. 50 serumprover screenades och titrerades på båda systemen. Dessa prover omfattade autoantikroppar som vanligtvis upptäckts med HEp-2-substrat, ovanliga och atypiska mönster och sera som är på gränsen till att vara negativa. Enzymresultaten stod till 98 procent i relation till Immuno Concepts immunofluorescerande ANA för test av positiva, negativa och blandade mönstersera (45).

Immuno Concepts fluorescerande ANA-testsystem har tidigare utvärderats genom jämförelse med två andra fluorescerande antikroppstester som finns på marknaden (45). Studien omfattade 97 serumprover från normala individer och diagnoser inklusive systemisk lupus erytematosus (SLE), blandad bindvävssjukdom (MCTD), Raynauds progressiva systemiska skleros-CREST-variant (PSS-CREST), reumatoid artrit (RA), reumatoid artrit hos barn (JRA) samt andra bindvävssjukdomar. Sera testades med de screeningspändingar som respektive tillverkare rekommenderade. Undersökningsresultaten sammanfattas i följande tabell. Tabell 2.

TABELL 2

DIAGNOS	Antal patienter	Immuno Concepts positiva 1:40	KB-cell positiva 1:20	Musjurre positiva 1:20
SLE	23	23	22	21
MCTD/överlappning	7	7	6	4
Raynaud's PSS-CREST	17	17	16	7
RA	2	2	2	0
JRA	4	4	4	3
Annan bindvävssjukdom	9	9	9	6
Sjukhuskontroller	11	7	3	2
Normala kontroller	24	1	1	0

Patienter som testades positivt i kategorin "annan bindvävssjukdom" med Immuno Concepts substrat hade temporär artrit (1), odifferentierad bindvävssjukdom (1), polymyosit (2), monoartrit (3), polyartrit (3) samt andra sjukdomar som inte klassificerats vidare.

Sjukhuskontroller som uppvisade positiva ANA med Immuno Concepts substrat hade diabetes (2), oklassificerad artrit (3), hypotyreos (1) och immunkomplex njursjukdom (1) som inte motsvarade kriteriet för diagnos av SLE.

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. Tan, E.M., Rodnan, G. P., Garcia, I., et al. Diversity of Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis. Arthritis Rheum. 23:617-625, 1980.
26. Miyachi, K., Fritzler, M. J., Tan, E.M. Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells. J. Immuno. 121:2228-2234, 1978.
27. 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.
28. 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.
29. Peter, V.B., Dawkins, R. L. Evaluating Autoimmune Diseases. Diagnostic Medicine. Sept. - Oct. 1979.
30. 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.
31. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. Ann. Int. Med. 83:464-469, 1975.
32. McDuffie, F. C., Burch, T.N. Immunologic Tests in the Diagnosis of Rheumatic Diseases. Bull. Rheum. Dis. 27:900-911, 1976.
33. von Mühlen, C. A., Tan, E. M. Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. Sem. in Arthritis and Rheum. 24:323-358, 1995.
34. 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.
35. Fritzler, M. J., Valencia, D.W., McCarty, G.A. Speckled Pattern Antinuclear Antibodies Resembling Anticentromere Antibodies. Arthritis Rheum. 27:92-96, 1984.
36. 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.

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

COLORZYME® ANA 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 högst 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 stängd 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 patientprovet till 1:40 genom att tillsätta 0,05 ml (50 µl) serum till 1,95 ml rekonstituerad PBS. Semikvantitativ bestämning av antikroppnivå: Gör 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(et) från påsen(-arna) och placera kontrollerat på kontrollbrunnarna enligt följande: Vänd upp och ned på pipettflaskan och kläm försiktigt tills det syns en droppe på spetsen. För försiktigt droppen mot rätt kontrollbrunn, men undvik direktkontakt mellan pipettspetsen och objektglasets yta. Tillsätt 1 droppe (20-25 µl) patientprov i de nummerade 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).
VARNING: DIREKTKONTAKT MELLAN PIPETTSPETSEN OCH OBJEKTGLASETS YTA KAN LEDA TILL ATT ANTIGENSUBSTRATET TAR SKADA.
- 5. ODLING AV OBJEKTGLASET (30 ± 5 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-25°C)**
Placera objektglas(et) i en fuktigt 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(et)-n från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS med sprutflaska, Pasteur eller serologisk pipett. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.
OBSERVERA: För att undvika att objektglasen korskontamineras kan du leda PBS-strålen längs objektglasets mittlinje genom att först luta objektglasen mot den övre raden av brunnar och därefter mot den nedre raden.
- 7. PBS-TVÄTTNING (10 minuter)**
Tvätta objektglas(et)-n i tio minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Försiktig omskakning rekommenderas vid nedsänkning, mittpunkt och avlägsnande av objektglas(et). Denna tvättning kan förlängas i 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas. Kassera PBS-tvättlösningen efter användning. För optimala resultat skall PBS ändras vid mittpunkten och en magnetisk blandare användas.
- 8. ENZYMEANTIKROPPREAGENS (Täck brunnarna med 12-14 droppar)**
Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS och doppa det 3-5 gånger i avjoniserat eller destillerat vatten. Knacka objektglasets sida mot ett läskpapper eller en pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. Återför genast objektglas(et) till inkubationskammaren och täck brunnarna helt med enzymantikroppreagens. Börja med att placera en droppe över varje brunn. Upprepa detta för varje objektglas. Enzymantikroppreagensen har titrerats för att kompensera för det avjoniserade eller destillerade vatten som är kvar på objektglas(et) 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 15 SEKUNDER.
- 9. ODLA OBJEKTGLASET (30 ± 5 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-25°C)**
Placera locket på inkubationskammaren och odla objektglas(et)-n i 30 minuter (± 5 minuter) i rumstemperatur (18-25°C).
- 10. PBS SKÖLJNING**
Avlägsna objektglas(et)-n från inkubatorbrickan och skölj hastigt med PBS. Spruta inte buffert direkt på brunnarna.
- 11. PBS-TVÄTTNING (10 minuter)**
Tvätta objektglas(et)-n i tio minuter med PBS i en objektglasfärgskål eller ett Coplin-kärl. Försiktig omskakning rekommenderas vid nedsänkning, mittpunkt och avlägsnande av objektglas(et). Denna tvättning kan förlängas med 10-30 minuter utan att de slutliga testresultaten påverkas.
- 12. ODLA FÄRGREAGENSEN (30 minuter i rumstemperatur, det vill säga 18-25°C)**
Avlägsna ett objektglas åt gången från PBS och doppa det 3-5 gånger i avjoniserat eller destillerat vatten. Knacka därefter objektglasets sida mot ett läskpapper eller en pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. Placera omedelbart objektglas(et) i ett Coplin-kärl med aktiverad färgreagens och odla i 30 minuter.
- 13. PBS-SKÖLJNING**
Avlägsna ett objektglas åt gången från Coplin-kärlet och skölj varje sida på objektglas(et) i 4-5 sekunder med PBS. Spruta inte buffert direkt på brunnarna. Placera varje PBS-sköljt objektglas i ett Coplin-kärl fyllt med avjoniserat eller destillerat vatten tills alla objektglas har avlägsnats från färgreagensen. Fortsätt omedelbart med steg 14.
- 14. MONTERING AV SKYDDSREMSA**
Avlägsna ett objektglas åt gången från det avjoniserade eller destillerade vattnet och knacka objektglasets sida mot ett läskpapper eller en pappershandduk för att avlägsna överskottsvatten. **TORKA ALDRIG OBJEKTGLASET MED LÄSKPAPPER ELLER ANNAT FÖREMÅL OCH LÅT ALDRIG OBJEKTGLASET STÅ UTAN SKYDDSREMSA LÄNGRE ÄN 15 SEKUNDER.** Tillsätt 4-5 droppar halvpermanent monteringsmedium längs mittlinjen på varje objektglas. Sätt försiktigt skyddsremsan på plats och undvik luftfickor genom att försiktigt lägga ned skyddsremsan från ena änden av objektglas(et) till den andra.
OBSERVERA: För många monteringsmedia på objektglas(et) kan leda till att cellerna inte får en klar upplösning (otydlig bild). Överflödigt monteringsmedium kan avlägsnas från objektglas(et) genom att skyddsremsan försiktigt torkas med läskpapper eller linspapper. Undvik att röra direkt vid skyddsremsan. Objektglas(et) kan avläsas direkt eller förvaras under en längre tid i 2-10°C utan att förlora reaktivitet.

TEKNISK HJALP: +1-916- 363-2649
eller e-mail: techservice@immunoconcepts.com